



**HAL**  
open science

# Etude des compartiments cellulaires impliqués dans la signalisation calcique au sein des astrocytes

Lucas Benoit

► **To cite this version:**

Lucas Benoit. Etude des compartiments cellulaires impliqués dans la signalisation calcique au sein des astrocytes. Neurosciences. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV060 . tel-03974619

**HAL Id: tel-03974619**

**<https://theses.hal.science/tel-03974619>**

Submitted on 6 Feb 2023

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Unité de recherche : Grenoble Institut des Neurosciences

**Etude des compartiments cellulaires impliqués dans la signalisation calcique au sein des astrocytes**

**Study of cellular compartments involved in calcium signaling in astrocytes**

Présentée par :

**Lucas BENOIT**

Direction de thèse :

**Karin PERNET-GALLAY**

Responsable Plateforme Microscopie électronique, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

**Andrea VOLTERRA**

Université de Lausanne

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

**Luc PELLERIN**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Poitiers

**Serge MARTY**

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Paris Centre

Thèse soutenue publiquement le **20 septembre 2022**, devant le jury composé de :

**Karine PERNET-GALLAY**

INGENIEUR HDR, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes

Directrice de thèse

**Andrea VOLTERRA**

PROFESSEUR, Université de Lausanne

Co-directeur de thèse

**Alain BUISSON**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

**Gilles BONVENTO**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation Ile-de-France

Examineur

**Luc PELLERIN**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Poitiers

Rapporteur

**Serge MARTY**

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Paris Centre

Rapporteur

**Nicolas TONI**

PROFESSEUR ASSOCIE, Université de Lausanne

Examineur





# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon jury de thèse, en particulier les rapporteurs Pr. Luc Pellerin et Dr. Serge Marty, d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail en un si court laps de temps. Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse Mireille Albrieux, Nicolas Toni et Yves Usson pour leur suivi intéressé et les conseils prodigués tout au long de ma thèse.

Je veux aussi remercier infiniment Karin Pernet-Gallay et Andréa Volterra, mes co-cadranants qui m'ont donné ma chance, leur confiance, et m'ont accompagné tout au long de cette thèse. Merci tout particulièrement à Karin pour ton accompagnement au cours de ce travail de longue haleine. Je sais que tu as toujours essayé de me prodiguer les meilleurs conseils pour que je puisse évoluer en tant que chercheur même si cela n'a pas toujours été facile. Merci à Andréa pour votre incroyable enthousiasme scientifique et vos apports de connaissance constants au cours de nos échanges.

Merci aux personnes impliquées dans ce projet aussi bien pour l'analyse d'image : Arnold Fertin, Carlos Vivar Rios et Yves Usson, pour la microscopie électronique : Pierre Henri-Jouneau et Daniel Spenher, et les expérimentations in situ : Erika Bindocci, Inès Hirestrovská, David Littevin et Roberta de Ceglia. Merci pour votre investissement, votre bonne humeur et vos incroyables apports au projet.

Je voudrais aussi remercier l'équipe d'Antoine Depaulis et en particulier Emel Laghouati, Colin Deransart et Isabelle Guillemain pour leur accueil au sein de leur peigne et pour avoir toujours été disponibles lorsque j'avais besoin d'aides.

Un grand merci aux personnes que j'ai croisées durant ma formation et qui m'ont soutenue lorsque nos chemins se sont croisés, me permettant d'en arriver là. Pour n'en citer que quelques-uns : Nora Abrous, Shaona Acharjee, Quentin Pittmann, Stéphane Oliet, Aude Panatier, Henri Schroeder et Pascaline Bouillau.

Merci aussi à Anne Bertrand, notre technicienne sur la plateforme, pour ton travail et ces petites discussions aux débottées.

Merci au personnel du GIN toujours présent en cas de besoin. Merci au GIN et à la direction qui ont permis l'organisation d'éléments sociaux bien que la crise sanitaire n'ait pas permis leur maintien. Ces événements m'ont permis de rencontrer de belles personnes, merci à elles et aux plaisirs de se revoir autour d'une bière.

Je voudrais remercier ma compagne, Pauline, qui m'a beaucoup soutenue en cette dernière année et qui a supporté mes états d'âme en rapport avec ce travail. Tu es exceptionnelle !

Merci à tous les amis qui m'ont toujours permis de décompresser quand c'était nécessaire. Merci à la team de Grenoble : Pierre, Rémi, Selma Stéphane, Titouffe et Xavier avec qui j'ai partagé un foyer et des moments formidables. Merci aux nancéiens qui m'accompagnent et qui me supportent depuis, pour certains, plus de 10 ans maintenant : Benjamin, Bubu, Castelli, Coco, Esteban, Flo, Joffrey, Lou, Nono, Gérard, Pierrick, Risse, Simon, Wild, et tous ceux que je pourrai oublier ... Vous êtes une sacrée bande de crétins et ça fait du bien !

Merci à toute ma famille qui a toujours été présente pour moi et m'a toujours encouragé à continuer dans cette voie.

Enfin, je tiens à faire une mention spéciale à mon grand-père qui nous a quittés lors de la finalisation de cette thèse. J'espère que je t'ai rendue fière...

## RÉSUMÉ SUCCINCT

Les astrocytes sont des cellules essentielles au maintien de l'homéostasie du système nerveux central (SNC). Ce ne sont pas des cellules électriquement excitables, mais l'évolution des techniques de microscopie optique et le développement de sondes calciques à haute résolution temporelle a permis de mettre en évidence qu'il existe un « langage » au sein des astrocytes qui repose sur des variations de la concentration intracellulaire en ions calciums. On sait désormais que 80-90 % de cette signalisation prend place dans des microdomaines qui sont localisés au niveau des prolongements cytoplasmiques les plus fins de l'astrocyte et qu'une partie de cette signalisation est corrélée à l'activité neuronale.

L'origine de ces signaux calciques est encore mal connue, à l'heure actuelle il n'y a d'ailleurs pas de caractéristique structurale évidente. Les études en microscopie bi photoniques ont montré que les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>R) généralement situés sur le réticulum endoplasmique jouent un rôle important dans cette signalisation, mais à ce jour, le lien entre le réticulum endoplasmique et les signaux calciques n'a pas été formellement établi. La difficulté principale résulte du fait que ces microdomaines sont d'une taille inférieure à la résolution des microscopes optiques, les études de microscopie électronique sont donc nécessaires pour résoudre l'ultrastructure fine de ces structures ; de plus, la morphologie des fins prolongements de l'astrocyte requiert des approches tridimensionnelles pour appréhender leurs interactions avec les éléments synaptiques.

Dans ce travail de thèse, nous avons tiré profit de nouvelles cryo-méthodes pour élaborer un protocole de préparation des échantillons pour la microscopie électronique qui préserve autant que possible l'ultrastructure des astrocytes ; nous avons pour cela comparé différentes méthodes de fixation d'échantillons. Ainsi, l'hippocampe de souris adultes a été sectionné au vibratome et les coupes ont été soit fixées avec des aldéhydes soit vitrifiées par congélation haute pression, ou encore fixées par une combinaison de ces deux méthodes. La préservation de la structure du tissu a ensuite été évaluée et nous avons ainsi montré que l'approche hybride est la mieux à même de préserver ces cellules. Il est donc possible de fixer légèrement les tissus avec des aldéhydes avant de

congeler les échantillons sans que cette étape n'altère l'ultrastructure. Ainsi, le protocole est compatible avec une fixation par perfusion et peut aussi être utilisé avec les stratégies de marquage par infrarouge proche permettant d'étudier les astrocytes par une approche corrélative en microscopie photonique et électronique.

En utilisant la stratégie de préparation des échantillons mise en place, nous avons ensuite utilisé un microscope à balayage à faisceau d'ions focalisés (FIB/SEM) pour imager, en 3D, des fragments d'astrocytes avec un voxel isotropique de 4 nm. Nous avons ensuite mis en place une méthodologie en analyse d'image pour réaliser une segmentation semi-automatique des fragments d'astrocytes et des compartiments intracellulaires tels que la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ainsi que de nombreuses synapses. Cette approche nous a permis d'obtenir des mesures quantitatives morphologiques en 3D : nous avons ainsi démontré la présence de saccule de réticulum endoplasmique dans les domaines les plus fins de l'astrocyte, domaines qui sont d'ailleurs dépourvus de mitochondries, mais qui sont les sites de contact avec les synapses. Nous avons également montré, par un immunomarquage en 3D, que ces compartiments du réticulum contiennent des récepteurs à l'inositol 3-phosphate, dont le rôle dans la signalisation calcique est connu.

Enfin, j'ai apporté mes compétences en analyse d'image pour segmenter une cellule Hela qui a été imagée avec la nouvelle technique de cryo-FIB/SEM, une technique qui permet d'imager en 3 D des échantillons vitrifiés sans qu'il ne soit nécessaire de les colorer avec des métaux lourds. J'ai ainsi montré qu'il était possible d'utiliser cette technique non seulement pour étudier l'ultrastructure cellulaire, mais aussi pour localiser des protéines intracellulaires. Cette approche ouvre donc des perspectives pour l'étude de l'astrocyte et de son organisation ultrastructurale à l'état natif.

## ABSTRACT

Astrocytes are essential cells that are involved in the maintenance of the central nervous system (CNS) homeostasis. These cells are not electrically excitable, but the evolution of optical microscopy techniques and the development of high temporal resolution calcium probes have made it possible to demonstrate that there is a 'language' within astrocytes that relies on variations in the intracellular concentration of calcium ions. It is now known that 80-90% of this  $\text{Ca}^{++}$  signalling takes place in microdomains located in the thinnest cytoplasmic extensions of the astrocyte and that part of this signalling is correlated with neuronal activity.

The origin of these calcium signals is still poorly understood, and at present there are no obvious structural features. Biphoton microscopy studies have shown that inositol triphosphate receptors (IP<sub>3</sub>Rs), generally located on the endoplasmic reticulum, play an important role in this signalling, but to date the link between the endoplasmic reticulum and calcium signals has not been formally established. The main difficulty is that these microdomains are smaller than the resolution of light microscopes, so electron microscopy studies are needed to resolve the fine ultrastructure of these structures; moreover, the morphology of the fine extensions of the astrocyte requires three-dimensional approaches to understand their interaction with synaptic elements.

In this thesis, we took advantage of new cryo-methods to set up an electron microscopy sample preparation protocol that optimally preserves the astrocyte ultrastructure. For this, we compared different sample fixation methods: adult mouse hippocampi were sectioned with a vibratome and the sections were either fixed with aldehydes or vitrified by high-pressure freezing, or fixed by a combination of these two methods. The preservation of the tissue structure was then assessed and we have shown that the hybrid approach is the most effective in preserving astrocytes. It is therefore possible to fix the tissue slightly with aldehydes before freezing the samples without altering the ultrastructure. The protocol is thus compatible with perfusion fixation and can also be used with near-infrared branding strategies to study astrocytes by using a correlative light and electron microscopy approach.

Using the established sample preparation strategy, we then used a focused ion beam scanning electron microscope (FIB/SEM) to image, in 3D, astrocyte fragments with a 4 nm isotropic voxel. We then implemented an image analysis methodology to perform semi-automatic segmentation of astrocyte fragments and intracellular compartments such as mitochondria, endoplasmic reticulum and numerous synapses. This approach allowed us to obtain quantitative 3D morphological measurements and we demonstrated the presence of the endoplasmic reticulum saccule in the thinnest domains of the astrocytes, domains which are also devoid of mitochondria but which are the sites of contact with synapses. We also showed, by 3D immunostaining, that these compartments of the endoplasmic reticulum contain inositol 3-phosphate receptors, which role in calcium signalling is well known.

Finally, I brought my image analysis skills to segment a HeLa cell that has been imaged with the new cryo-FIB/SEM technique, a technique that allows 3D imaging of vitrified samples without the need of any staining with heavy metals. I have shown that it is possible to use this technique not only to study cell ultrastructure but also to localise intracellular proteins. This approach thus opens up perspectives for the study of the astrocyte and its ultrastructural organisation in its native state.

## Table des matières

<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>11</b>
<b>PRÉAMBULE</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre I: La microscopie électronique 3D pour l'étude de l'organisation du système nerveux central</b>	<b>19</b>
I. La microscopie électronique	19
I.A. La formation d'image	19
I.B. L'acquisition 3D	20
I.B.1. La tomographie électronique	21
I.B.2. Les coupes sériées et la microtomie dans le microscope à balayage	22
I.B.3. Le microscope électronique à balayage à faisceau d'ions focalisés	24
I.C. La préparation des échantillons	25
I.D. L'immuno-localisation en microscopie électronique	29
II. L'analyse d'image en 3D	33
<b>Chapitre II: L'Astrocyte une cellule aux nombreuses fonctions</b>	<b>39</b>
I. Généralité	39
I.A. Histoire d'une découverte	39
I.B. L'identification des astrocytes	39
II. Une cellule singulière au sein du système nerveux central	43
II.A. Le ratio neurones/astrocytes	43
II.B. La diversité des populations astrocytaires	44
II.C. Le territoire astrocytaire et réseau astrocytaire	45
II.D. La signature électrophysiologique des astrocytes	45
II.E. L'astrocyte, une morphologie particulièrement complexe	46
III. Les Interactions entre les neurones et les astrocytes	49
III.A. L'hippocampe, le gyrus denté et l'astrocyte	50
III.A.1. L'organisation de l'hippocampe	50

III.A.2. Les astrocytes au sein du gyrus denté _____	52
III.A.3. La synapse glutamatergique _____	53
III.A.4. La plasticité de la synapse glutamatergique _____	57
III.B. La synapse tripartite _____	58
III.B.1. Les interactions morphologiques entre la synapse et l'astrocyte _____	59
III.B.2. Le contrôle métabolique : _____	60
III.B.3. L'homéostasie ionique - Balance extra synaptique des ions _____	61
III.B.4. La glio-transmission _____	61
III.B.5. La recapture et recyclage des neurotransmetteurs _____	63
III.B.6. La plasticité synaptique et remaniement morphologiques astrocytaires _____	63
IV. D'autres rôles de l'astrocyte dans le SNC _____	65
IV.A. L'Astrocyte dans la modulation du transport de l'eau au niveau cérébral _____	65
IV.B. Le contrôle du Flux sanguin _____	66
IV.C. Les astrocytes dans l'inflammation du SNC : _____	66
V. Conclusion intermédiaire _____	67
<b>Chapitre III: La signalisation calcique au sein de l'astrocyte _____</b>	<b>69</b>
I. L'ion Ca <sup>2+</sup> un messager ubiquitaire _____	69
II. Méthodes expérimentales pour étudier la signalisation calcique : _____	71
II.A. Imagerie calcique : _____	71
II.A.1. Les colorants organiques : _____	71
II.A.2. Les biocapteurs : _____	71
II.A.3. Les indicateurs calciques génétiquement encodés : _____	72
III. L'origine des signaux calcique au sein de l'astrocyte : _____	73
III.A. Compartiments intracellulaires impliqués dans la signalisation calcique _____	74
III.A.1. Le réticulum endoplasmique : _____	74
III.A.1. La mitochondrie _____	78
III.A.2. Synergie entre réticulum endoplasmique et mitochondrie dans la signalisation calcique astrocytaire : _____	79

III.A.3. Morphologie de l'astrocyte et localisation des compartiments intracellulaires :	82
III.B. Les acteurs de la membrane plasmique dans la signalisation calcique :	84
<b>Résumé et problématique de la thèse</b>	<b>89</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>91</b>
Chapitre I: Bioprotocole n°1 : Étude de l'ultrastructure 3D des astrocytes dans le tissu avec la technique de congélation haute pression et de microscopie électronique à faisceau d'ions focalisé	93
Chapitre II: Bio-protocole n°2 : Analyses d'images en 3D de l'organisation ultrastructurale de l'astrocyte en FIB/SEM	109
Chapitre III: Bio-protocole n°3 : Localisation en 3D par immunomarquage à l'or en pré-enrobage des récepteurs à l'inositol triphosphate dans l'astrocyte	117
<b>RESULTATS</b>	<b>125</b>
Chapitre I: Étude morphologique en microscopie électronique : comparaison de la préservation de l'astrocyte entre méthodes cryogéniques et conventionnelles	125
Chapitre II: Les corrélats ultrastructuraux qui sous-tendent la signalisation calcique de l'astrocyte	149
Chapitre III: Le Cryo FIB-SEM, un outil prometteur pour la localisation des protéines en 3D (Spehner et al. 2020)	171
<b>DISCUSSION</b>	<b>181</b>
I. Préservation de l'ultrastructure des astrocytes	181
II. Corrélats morphologiques des microdomaines calciques des prolongements les plus fins de l'astrocyte : un site de communication avec les synapses	184
I. La microscopie électronique cryogénique 3D, une perspective pour l'étude de l'astrocyte ?	190
II. Conclusion et perspective	191
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>193</b>



# ABRÉVIATIONS

**ALDH1L1**-aldehyde dehydrogenase 1 family member L1

**AMPA**-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolepropionic acid

**AMPc**-adénosine 3'5'monophosphate

**ANG-1**-angiotensine 1

**APOE**-apolipoprotéine E

**AQP4**-aquaporine 4

**ARNm**-acid ribonucléique messenger

**ATP**-adénosine triosphate

**ATUM**-automated tape-collecting ultramicrotome

**Best-1** -bestrophine-1

**bFGF**-basic fibroblast growth factor

**BHE**-barrière hématoencéphalique

**CA**-Cornu Ammonis

**CaM**-Calmoduline

**CIRCE**-calcium induces calcium release

**CPA**-cyclopiazonic acid

**CX**-connexine

**DG**-dentate gyrus

**EAAT**-excitatory amino-acid transporter

**EpH**-éphrin

**ET**-electron tomography

**FCCP**-carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

**FIB/SEM**-focus ion beam scanning electron microscopy

**GCL**-granular cell layer

**GDNF**–glial cell derived neurotrophic factor

**GPCR**–g protein-coupled receptors

**GECI**–genetically encode calcium indicator

**GFAP**–glial fibrillary acidic protein

**GLAST**–glutamate aspartate transporter

**GLT-1** –glutamate transporter 1

**HPF**–high pressure freezing

**IGBMC**–intstitut de génétique, biologie moléculaire et cellulaire

**iGluR**–récepteur ionotropique du glutamate

**IP<sub>3</sub>**–inositol triphosphate

**IP<sub>3</sub>R**–ionositol triphosphate receptors

**Kir**–inwardly rectifying potassium channel

**KO**–knock-out

**LCS**–liquide cérébro-spinal

**LTD**–long term depression

**LTP**–long term potentiation

**MAM**–mitochondria associated membrane

**mCU**–mitochondrial calcium uniportr

**ME**–microscopie électronique

**MERC**–mitonchondria endoplasmique reticulum contacts

**MEB**–microscopie électronique à balayage

**MET**–microscopie électronique à transmission

**Mfn**–mitofusin

**mGluR**–récepteur métabotropique du glutamate

**MIB**–microscopy image browser

**mPTP**–mitochondria permeability transition pore

**NMDA**–N-méthyl-D-aspartate  
**NCX**–échangeur sodium calcium  
**NCLX**–mitochondrial sodium calcium exchanger  
**OsO<sub>4</sub>**–tétroxyde d’osmium  
**P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>**–purinocepteur 1  
**PAP**–perisynaptic astrocytic process  
**PIP<sub>2</sub>**–phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate  
**PLC**–phospholipase C  
**PSD**–post-synaptic densities  
**sEPSC**–spontaneous excitatory post-synaptic current  
**SBF/SEM**–serial block face scanning electron microscopy  
**SNARE**–soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor  
**SNC**–système nerveux central  
**SOCE**–store operated calcium entry  
**TNF $\alpha$** –tumor necrosis factor  $\alpha$   
**TRPA<sub>1</sub>**–transient receptor potential ankyrin 1  
**TSP**– thrombospondin-1  
**TTX**–tétrodotoxine  
**VDAC**–voltage dependent anion channel  
**VGCC**–voltage gated calcium channel  
**V-Glut<sub>1</sub>**– vesicular glutamate transporter 1  
**VEGF**–vascular endothelial growth factor  
**VF**–volume fraction  
**WT**–wild type



## PRÉAMBULE

La microscopie électronique et son évolution ont considérablement amélioré notre compréhension de l'organisation du système nerveux central (SNC). Cependant, la morphologie des astrocytes est encore mal décrite et peu d'études, à ce jour, ont correctement abordé l'organisation subcellulaire des astrocytes *in situ*.

L'étude de l'ultrastructure des astrocytes représente un véritable défi pour les microscopistes. Les astrocytes sont de très grandes cellules (diamètre moyen : 50  $\mu\text{m}$ ), mais les extensions les plus fines des astrocytes, les leaflets, peuvent être inférieures à 100 nm, ce qui les rend inobservables en microscopie optique conventionnelle (Khakh et Sofroniew 2015). Ainsi, les études de microscopie électronique sont nécessaires pour résoudre avec précision l'ultrastructure des astrocytes. Cependant, les astrocytes ont une teneur en eau élevée par rapport à d'autres cellules et sont très sensibles aux changements osmotiques. La préparation conventionnelle des échantillons en microscopie électronique a été suggérée comme étant délétère pour préserver la morphologie des astrocytes. Une étude utilisant la cryofixation (HPF) et la comparant à la fixation chimique conventionnelle a décrit des changements morphologiques tels que : moins d'interactions entre les processus astrocytaires et les synapses et moins de couvertures des vaisseaux sanguins par les extrémités des astrocytes (Korogod, Petersen, et Knott 2015).

La première partie de mon travail de thèse a consisté à mettre en place un protocole de préparation des échantillons qui préserve au mieux l'ultrastructure pour l'obtention d'images en microscopes électroniques à balayage à faisceau d'ions focalisé (FIB/SEM ; Focus Ion Beam/Scanning Electron Microscopy) des astrocytes de la couche moléculaire du gyrus denté chez la souris. J'ai pu atteindre cet objectif grâce à l'utilisation de manière combinée de deux techniques de fixation : une fixation préalable par perfusion intracardiaque au Glutaraldéhyde avec une concentration réduite permettant de préserver l'osmolarité dans le tissu et la congélation haute pression suivie de la substitution à froid rendant possible la coloration aux métaux lourds des membranes cellulaires nécessaires à l'imagerie FIB/SEM. J'ai par la suite

## PRÉAMBULE

démontré que ce type de protocole permet un très haut niveau de préservation du tissu nerveux dans l'hippocampe.

La seconde partie de mon travail de thèse se concentre sur l'étude ultra structurale des astrocytes. Pour cela, j'ai mis en place, avec l'aide de collaborateurs extérieurs, un nouveau plan de travail permettant l'analyse de larges volumes de données pour en tirer des mesures quantitatives permettant de répondre à nos questionnements biologiques. Mon travail de thèse s'articule en effet avec les études réalisées dans le laboratoire du Professeur Andréa VOLTERRA, un expert dans l'étude de la signalisation calcique astrocytaire. Plus particulièrement, les travaux de son équipe ont permis de lever le voile sur l'incroyable complexité et variabilité de la signalisation calcique astrocytaire. Mon travail a permis d'obtenir de nombreuses données morphométriques en lien avec les structures impliquées dans la signalisation calcique dans plusieurs types cellulaires comme dans l'astrocyte : les mitochondries et le réticulum endoplasmique. J'ai aussi contribué à décrire plus finement de larges domaines constitués exclusivement de prolongement très fin de l'astrocyte (diamètre inférieur à 200 nm) contactant de nombreuses synapses. Pour la première fois, j'ai démontré la présence de saccules de réticulum endoplasmique isolé au sein de ces leaflets exprimant des canaux calciques spécifiques à leur membrane. En collaboration avec cette équipe, nous avons ainsi pu démontrer la présence d'une signalisation calcique spécifique à ces domaines.

La troisième partie de mon travail de thèse a été réalisé en collaboration avec l'IGBMC de Strasbourg. Mon travail dans ce projet a consisté à utiliser mon protocole d'analyse d'image sur une pile d'images 2D d'une cellule HELA obtenue en cryo-microscopie électronique à balayage à faisceau d'ions focalisé (Cryo-FIB/SEM) pour obtenir une reconstruction 3D de cette cellule malgré les moindres contrastes obtenus par cette méthode d'imagerie. Cette technique permet un niveau supérieur de préservation du tissu, mais aussi la localisation précise de protéines. Cette étude ouvre donc de nouvelles possibilités pour l'étude des astrocytes en microscopie électronique.

Pour situer mes travaux de thèses dans leur contexte scientifique, j'introduirai tout d'abord l'état de l'art en microscopie électronique et en analyse d'image. Par la suite, j'introduirai les bases biologiques de l'astrocyte ainsi que ses rôles dans le tissu

## PRÉAMBULE

nerveux. Je finirai par introduire la signalisation calcique en général, puis plus précisément au sein de l'astrocyte en insistant sur son rôle potentiel dans la régulation de la physiologie astrocytaire.



## INTRODUCTION

### Chapitre I: La microscopie électronique 3D pour l'étude de l'organisation du système nerveux central

Le système nerveux central est un objet d'étude complexe. Composé de l'encéphale et de la moelle épinière le SNC est composé de nombreuses cellules. Parmi ces cellules, on trouve les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies qui interagissent entre elles et permettant ainsi l'intégration d'une multitude d'informations. Cette intégration s'exécute toutes les fractions de seconde tout en produisant une réponse adaptée à l'environnement et aux besoins de l'organisme. La peau et les organes des sens forment une batterie de capteurs qui vont faire circuler l'information par l'intermédiaire de fibres nerveuses vers le cerveau en passant par la moelle épinière. Ces informations seront par la suite traitées au niveau du cerveau pour être renvoyées vers des effecteurs comme les muscles pour engendrer un comportement. La compréhension de cette machinerie fine repose en partie sur l'organisation morphologique de ces cellules dans le tissu et pour cela des techniques précises sont nécessaires. La microscopie électronique est une de ces techniques et a fait ses preuves dans l'étude du SNC. Nous allons voir dans ce chapitre les différentes modalités d'acquisition en microscopie électronique puis nous développerons en particulier la microscopie électronique 3D en illustrant leurs utilisations par des exemples d'application dans le domaine des neurosciences.

#### I. La microscopie électronique

La microscopie électronique repose sur l'irradiation d'un échantillon par un faisceau d'électrons et la détection de l'électron transmis ou diffusé par l'échantillon.

##### I.A. La formation d'image

Il existe deux paradigmes pour acquérir une image en microscopie électronique : la microscopie électronique à transmission (MET) et la microscopie électronique à balayage (MEB).

## INTRODUCTION

D'une part, en MET l'échantillon doit être placé entre la source d'électrons et la lentille de détection (Figure I-1, A). L'échantillon doit être suffisamment fin pour que le faisceau d'électrons puisse le traverser et construire une image sur la lentille. Pour assurer cette transmission, des sections "ultrafines" (30-100 nm d'épaisseur) sont collectées et colorées avec des sels de métaux lourds pour augmenter leur contraste. L'interaction du faisceau avec les structures colorées crée une ombre sur la lentille. La MET offre une résolution radiale subnanométrique idéale pour étudier l'ultrastructure d'un échantillon biologique. Cette technique reste la technique la plus résolue en biologie (J. R. Harris 2015) bien qu'à ses débuts, elle ne permettait pas d'observer en 3D.

D'autre part, le MEB est également basé sur l'interaction entre un faisceau d'électrons et les structures de l'échantillon. Cependant, les électrons collectés sont soit les électrons du faisceau primaire rétrodiffusés par l'échantillon soit ceux que l'on nomme électron secondaire. Les électrons secondaires sont les électrons de l'échantillon arrachés suite à la rencontre avec le faisceau primaire (un électron primaire peut donc produire un ou plusieurs électrons secondaires). Les électrons secondaires sont caractérisés par une très faible énergie et ces derniers permettent l'obtention d'image de la topologie des échantillons extrêmement résolue. Pour capter ces électrons, le détecteur est placé du même côté que la source du faisceau qui balaie l'échantillon. Les électrons sont détectés pour chaque position du faisceau (Figure I-1, B). Le MEB permet d'obtenir une résolution nanométrique et les électrons secondaires apportent des informations sur la surface d'un échantillon qui est recouverte de particules conductrices (Skepper 2000), tandis que les électrons rétrodiffusés apportent des informations sur l'ultrastructure cellulaire si l'échantillon est inclus en résine et abrasé pour exposer ses structures internes (Briggman et Bock 2012; Shah, Ruscsák, et Palmquist 2019).

### I.B. L'acquisition 3D

Traditionnellement, en biologie, la MET permet la description en 2D d'un échantillon biologique tandis que le MEB fournit des images de la topologie d'un échantillon (électrons secondaires) ou des images 2D d'échantillons abrasés exposant leurs structures internes (électrons rétrodiffusés). Aujourd'hui, plusieurs stratégies utilisant

ces deux techniques ont été développées pour obtenir des images 3D des structures internes d'un échantillon biologique.

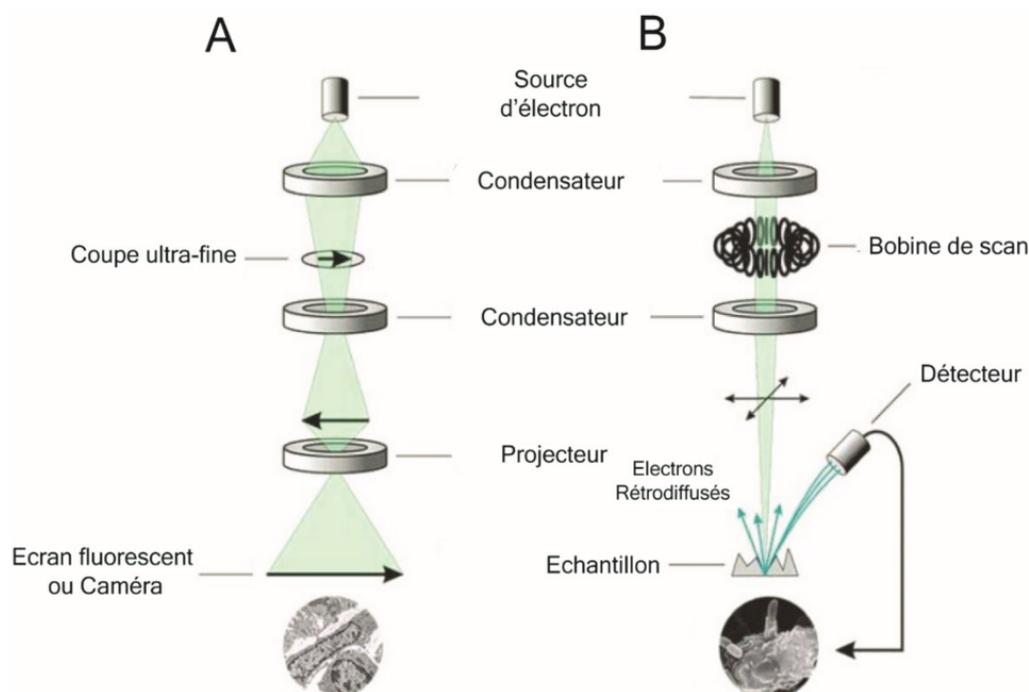


Figure I-1: Formation de l'image en microscopie électronique

(A) Organisation standard d'un microscope électronique à transmission (MET). Le faisceau d'électrons est focalisé par des lentilles électromagnétiques, traverse l'échantillon ce qui provoque la dispersion d'une partie de ces électrons. Ces électrons forment par la suite une image sur un écran fluorescent ou une caméra. (B) Organisation standard d'un microscope électronique à balayage (MEB ou MEB). Le faisceau d'électrons est focalisé sur la surface de l'échantillon et déplacé par la bobine de scan. Les électrons rétrodiffusés ou les électrons secondaires renvoyés par l'échantillon sont ensuite captés par un détecteur placé du même côté que la source du faisceau. L'image est ensuite reconstituée par ordinateur.

### I.B.1. La tomographie électronique

La tomographie électronique (TE) est utilisée en biologie structurale pour résoudre les structures protéiques qui ne peuvent pas être résolues par la MET conventionnelle (Raunser 2017). Pour obtenir une micrographie électronique 3D, plusieurs images d'un échantillon MET sont acquises sous différents angles (Figure I-2, A/B). Ces acquisitions permettent la reconstruction d'une pile d'images coaxiales et alignées appelée tomogramme (Figure I-2, C/D). En biologie cellulaire, ces tomogrammes sont

## INTRODUCTION

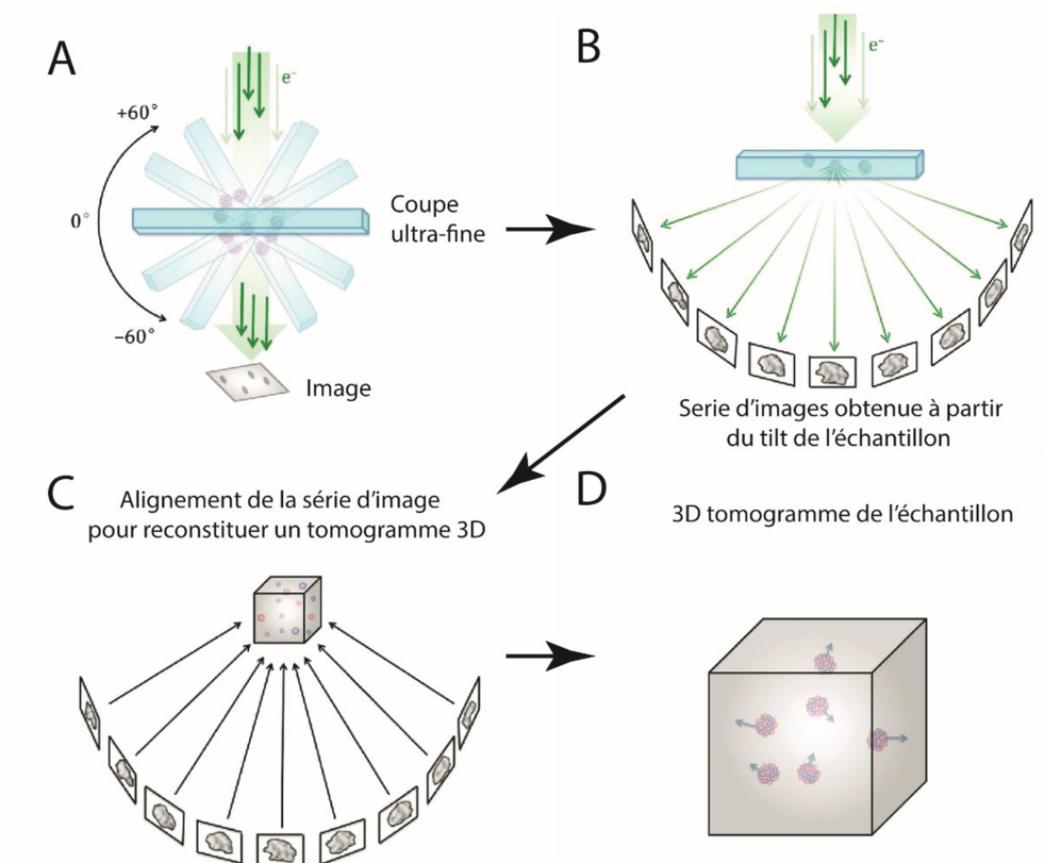


Figure I-2 : Schéma de l'acquisition d'images en TE :

(A, B) La coupe ultra-fine est placée dans la colonne sur une grille est inclinée successivement pour obtenir une série d'images. (C, D) La série d'images est alignée par informatique pour reconstruire le tomogramme 3D de l'échantillon. (Adapté de Galaz-Montoya and Ludtke, 2017)

utilisés pour décrire l'ultrastructure de tranches de 100-200 nm d'épaisseur avec une résolution de quelques nanomètres (Kukulski et al. 2012).

### I.B.2. Les coupes sériées et la microtomie dans le microscope à balayage

Cette technique consiste à recueillir successivement des coupes ultrafines d'un échantillon, ces coupes sériées sont ensuite observées séquentiellement. La

récupération des coupes en série peut être manuelle (Figure I-3, A) ou automatisée à l'aide d'un dispositif disposé sur l'ultramicrotome (ATUM ; Automated Tape-collecting Ultramicrotome ; Figure I-3, B) et permet la reconstruction de l'ultrastructure 3D d'un échantillon (Hayworth et al. 2015 ; G. W. Knott et al. 2006 ; Nägerl et al. 2007 ; Zito et al. 1999). Bien que le prélèvement de coupes sériées soit un outil puissant, il présente certaines limites dues à la nécessité d'aligner les images 2D après l'acquisition afin de reconstruire l'échantillon. Cette étape peut être réalisée manuellement ou informatiquement. Cependant, il est évident que pour de très larges volumes de données avec une haute résolution, il est difficile d'obtenir une précision équivalente de façon manuelle à une opération mathématique gérée par informatique. Le temps d'alignement serait extrêmement long et la qualité de l'information obtenue diminuée due aux nombreuses sources d'imprécisions causées par un alignement réalisé par un opérateur humain. Cette dernière étape est donc limitée par les propriétés du matériel informatique disponible et diminue le volume possible pouvant être observé (Begemann et Galic 2016). De plus, l'épaisseur des coupes ultrafines pouvant être obtenue limite la résolution en Z.

Le développement de la microscopie électronique à balayage permettant l'acquisition de série d'images de la face d'un échantillon en résine (Serial Block Face Scanning Electron Microscopy en anglais ; SBF/SEM) est une technique reposant sur la combinaison d'un microscope électronique à balayage avec un ultramicrotome (Figure I-3, C). Ce dispositif permet donc l'imagerie en série de la face du bloc d'échantillon successivement coupé à l'aide de l'ultramicrotome directement dans la chambre du MEB. Le SBF/SEM permet d'obtenir une résolution Z allant jusqu'à 25 nm tout en maintenant la résolution du MEB avec un traitement post-acquisition minimal. Cette technique comble parfaitement le fossé entre la tomographie électronique à haute résolution et la microscopie photonique à haute résolution en permettant l'acquisition de volumes plus importants (Denk et Horstmann 2004).

La SBF-SEM a été utilisée très rapidement pour obtenir des informations sur l'ultrastructure et la connectivité du tissu nerveux. En effet, elle a permis l'acquisition d'informations détaillées sur le diamètre des axones, le diamètre des fibres, l'épaisseur de la myéline et les organelles (Mukherjee et al. 2016).

## INTRODUCTION

### I.B.3. Le microscope électronique à balayage à faisceau d'ions focalisés

Des microscopes électroniques à balayage couplés à un faisceau d'ions focalisés ont d'abord été utilisés en sciences des matériaux et le faisceau d'ions gallium était avant tout destiné à la réalisation de nanogravures ou le façonnage de pièces à l'échelle nanométrique. Cependant, ce faisceau d'ions peut également être utilisé pour le fraisage itératif d'une surface permettant ainsi l'acquisition de piles d'images d'un échantillon biologique enrobé de résine. Plus précisément, après chaque abrasion, la surface de l'échantillon est imagée de manière automatisée avec un détecteur d'ions rétrodiffusés (Figure I-3, D) (Wei et al. 2012) ; ce processus itératif d'abrasion et d'acquisition d'images permet ainsi d'obtenir une reconstruction en 3D d'un échantillon biologique (Heymann et al. 2006 ; G. Knott et al. 2008). La résolution en Z est de 3 à 5 nm, un niveau de précision qui donne la possibilité d'obtenir un volume avec un voxel isotropique. Il s'agit donc d'un outil de choix pour les biologistes cellulaires, car il donne l'accès à l'observation des macromolécules et des organites dans la structure tridimensionnelle de la cellule. Bien que le FIB-SEM n'offre pas la même résolution latérale que la MET, c'est la seule technique qui permet de collecter des coupes sérielles avec un champ de vue de quelques dizaines de micromètres carrés et un voxel isotropique d'environ 5 nm.

L'une des limites du FIB-SEM est le temps d'acquisition (environ 1 minute par image pour un champ de vue de 100  $\mu\text{m}^2$ ), comme les instruments ne sont pas toujours très stables, il est donc difficile d'imager des volumes importants, une limitation qui empêche en particulier d'obtenir des données connectomiques larges. Un autre défaut qui peut être constaté sur les piles d'images est la formation d'irrégularités telles que le « curtaining » (augmentation de la rugosité de l'échantillon à cause du fraisage) et la redéposition du matériau vaporisé. Pour répondre à ces deux dernières limitations, les chercheurs ont mis au point une nouvelle technique dite de "stitching" (ou recombinaison en français) en volume (Hayworth et al. 2015). Cette technique consiste à découper proprement un bloc d'échantillon et chaque pièce sera imagée une par une. Il est ainsi possible de suturer par informatique chaque pile d'images avec suffisamment de précision pour produire des piles connectomiques à grande échelle. Récemment, une équipe de Janelia a imagé avec le FIB-MEB le 1/4 d'un cerveau de

mouche, démontrant que la limitation de la technique peut être surmontée avec ingéniosité (Scheffer et al., 2020).

### I.C. La préparation des échantillons

La microscopie électronique conventionnelle repose sur une préparation complexe de l'échantillon impliquant une fixation à l'aldéhyde, une osmification, une déshydratation et une inclusion dans une résine plastique. Bien que cette préparation

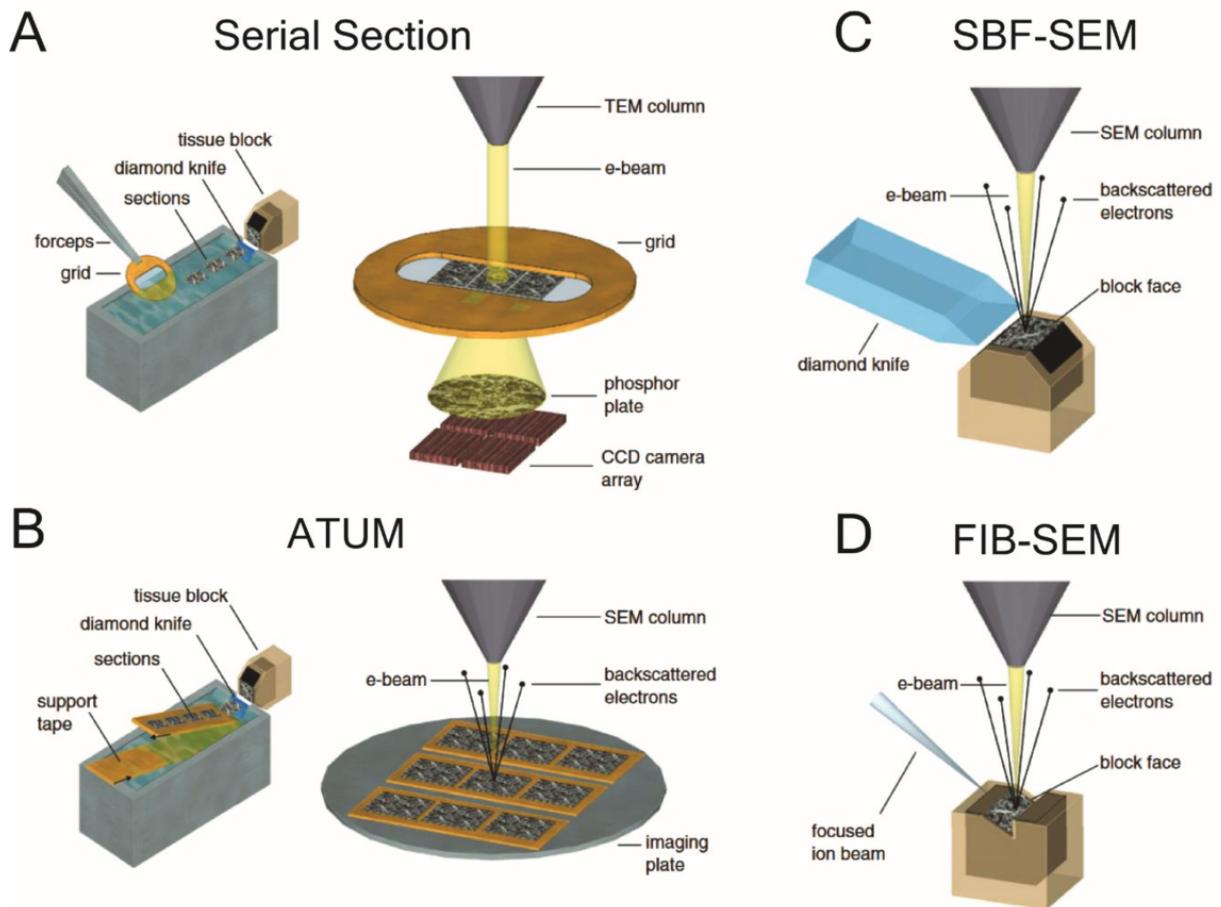


Figure I-3 : Schémas des différentes techniques de microscopie électronique 3D :

(A) Représentation schématique de la préparation de coupe sériée de façon manuelle. Les coupes sérielles sont ensuite imagées une par une en MET. (B) Représentation schématique de l'obtention de coupes sérielles de façon automatisée sur des plaques de support permettant ensuite une acquisition d'image par MEB. (C) Représentation schématique du dispositif d'acquisition d'image en « serial block face scanning electron microscopy » (SBF-MEB). (D) Représentation schématique du dispositif d'acquisition d'image en microscopes électroniques à balayage couplé à un faisceau d'ions focalisé. (Adapté de Briggman et Bock, 2012.)

## INTRODUCTION

ait été et soit encore largement utilisée dans le domaine de la biologie cellulaire, il a été suggéré que cette technique entraînait une modification artéfactuelle de l'ultrastructure des tissus (Korogod et al., 2015; Möbius et al., 2010a), un constat qui est apparu à la suite du développement de nouvelles techniques de cryo fixation.

La cryofixation correspond à la vitrification d'échantillons biologiques, qui permet une meilleure conservation des constituants moléculaires de la cellule, plus proches de leur état naturel. Cependant, les échantillons biologiques sont principalement constitués d'eau qui peut être cristallisée lors de la congélation. L'ultrastructure des cellules peut être endommagée en raison de l'expansion volumique causée par la cristallisation, ce qui ne se produit pas avec la vitrification. La vitrification est la transformation d'une substance en un état amorphe semblable à du verre. Pour rendre la vitrification possible, la température doit diminuer rapidement par immersion dans un liquide cryogénique (par exemple l'azote liquide) ou par congélation à haute pression (HPF) (Milne et al. 2013).

L'échantillon 2D ne nécessite qu'un contact direct avec le liquide cryogénique. Cependant, cette méthode ne peut pas être appliquée à des échantillons épais tels que des tranches de tissus en raison de la faible conductivité thermique de l'eau vitrifiée. Par conséquent, la condition pour éviter la cristallisation au centre du tissu ne sera pas remplie et l'ultrastructure des cellules ne sera pas préservée comme prévu. De plus, cela limiterait l'observation du tissu sous 10  $\mu\text{m}$  (Rostaing et al. 2006). En congelant rapidement avec de l'azote (-196°C) à très haute pression (2100 bars), un échantillon immergé dans un cryoprotecteur placé dans un porte-échantillon à haute conductivité thermique, la HPF permet la vitrification d'échantillons jusqu'à 300 - 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Dahl et Staehelin 1989; McDonald 1999; Shimoni et Müller 1998).

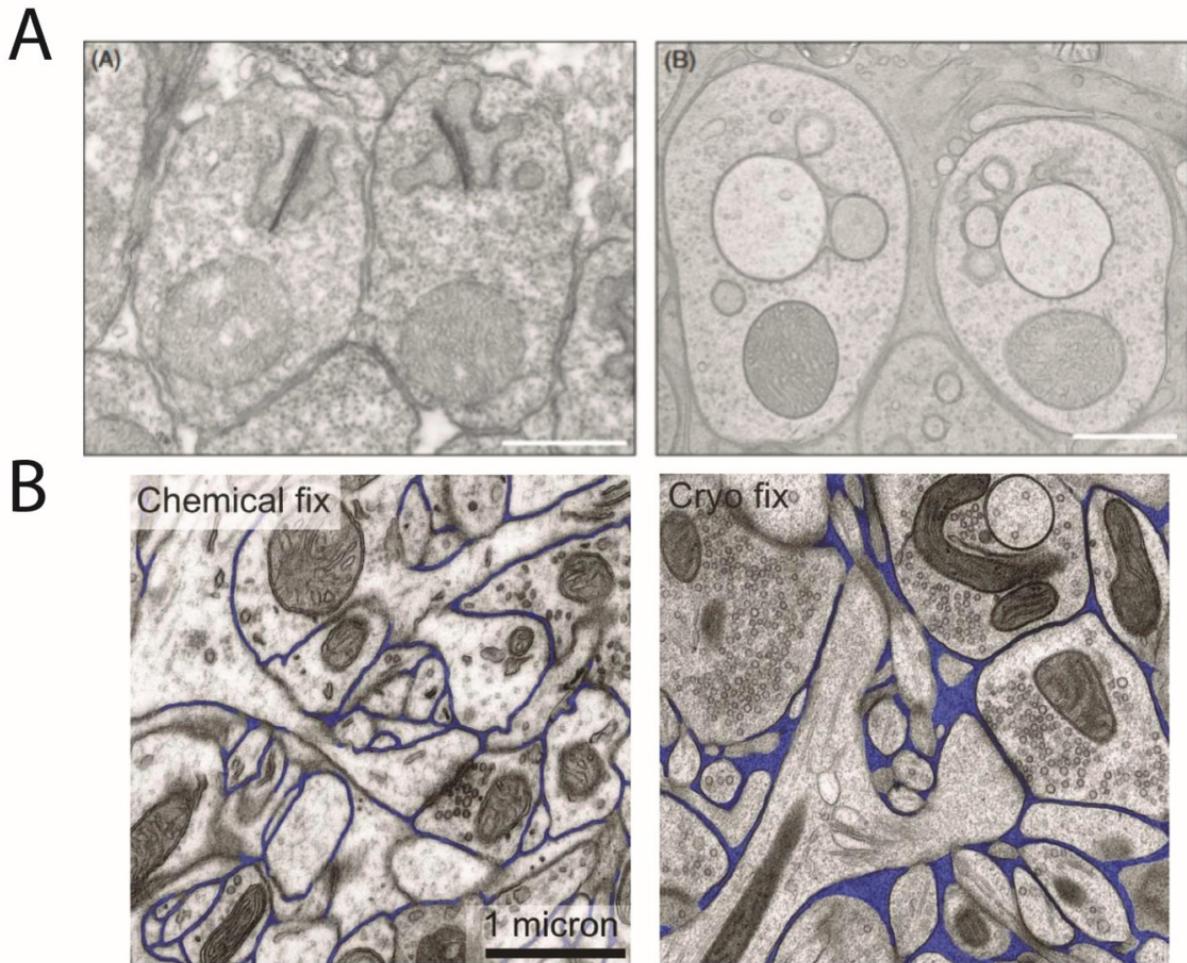


Figure I-4 : Comparaison de l'espace extracellulaire dans le tissu nerveux en fixation chimique et vitrification

(A) Série d'images de la préservation de l'ultrastructure du tissu rétinien et de ces organelles chez la souris suite à une fixation par perfusion suivie d'une préparation chimique conventionnelle (A : A) ou de tissu frais fixé par cryofixation (A : B) (Adaptée de Möbius et al., 2010). (A) Comparaison de la préservation du neuropile du cortex d'une souris frais fixé par cryofixation et fixé par perfusion de paraformaldéhyde suivie d'une préparation chimique conventionnelle pour la ME. Plus d'espace extracellulaire (surimprimé en bleu) est observé lorsque l'échantillon est fixé par cryofixation en comparaison avec une fixation chimique. On peut aussi observer que les membranes sont plus lisses et que les organelles semblent être mieux préservées en cryofixation. (Adaptée de Korogod et al., 2015)

## INTRODUCTION

Bien que la congélation haute pression permette une fixation d'échantillon épais, celle-ci ne permet pas toujours une préservation optimale de la totalité de l'échantillon. Dans les zones les mieux préservées, les éléments cellulaires dans le tissu nerveux tels que les membranes sont plus lisses, et les organelles sont bien préservées (Figure I-4, A,) en comparaison avec des échantillons préparés par fixation chimique conventionnelle. Il a été aussi observé que l'espace extracellulaire dans le tissu nerveux de la souris est altéré par la fixation chimique. On notera qu'une étude réalisée dans le cortex de souris montre un espace extracellulaire plus important lorsque le tissu est fraîchement fixé par cryofixation tandis qu'une étude réalisée au niveau de la rétine chez la souris montre un espace extracellulaire plus restreint dans cette condition comparée à la fixation chimique conventionnelle pour la ME (Figure I-4, B).

Cependant, dans des régions moins préservées, on peut observer des profils cellulaires similaires à ceux observés en fixation chimique tels que des membranes rugueuses et discontinues au niveau cellulaire (figure 5, A) comme au niveau de l'enveloppe nucléaire (figure I-5, B) et des mitochondries avec des crêtes mitochondriales irrégulières (figure I-5, C).

Le développement des cryo-microscopes électroniques tels que le cryo-MET ou le Cryo-FIB/SEM permet l'observation d'échantillons dans leur état natif tout en préservant les potentialités optiques de ces techniques en travaillant directement sur l'échantillon vitrifié (Al-Amoudi et al. 2004 ; Schertel et al. 2013). Bien que ces techniques soient de plus en plus présentes, leur utilisation dans le domaine des neurosciences reste mineure.

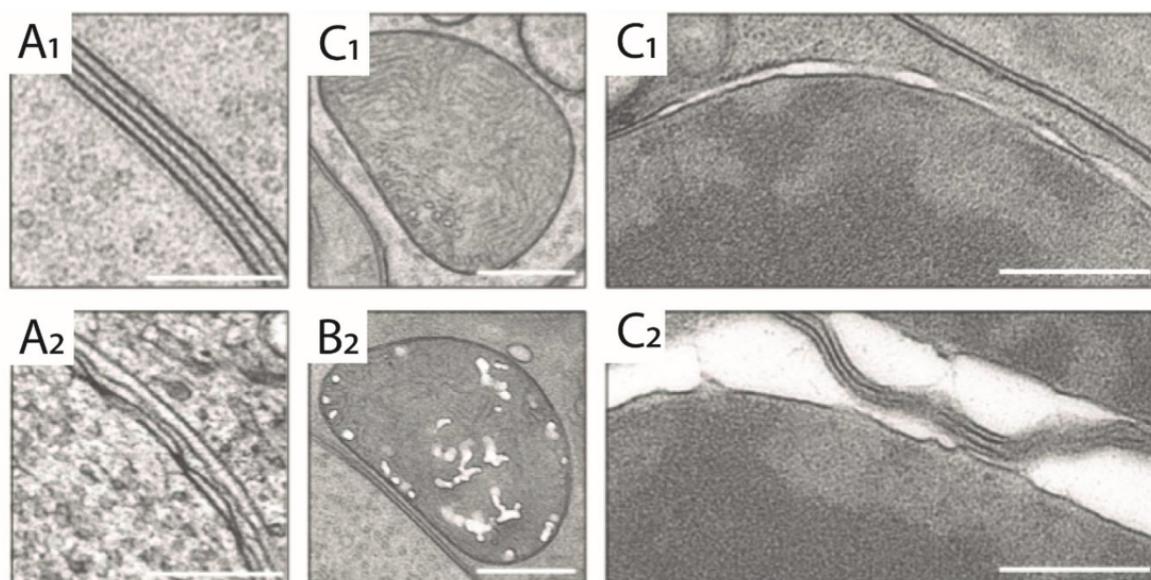


Figure I-5 : Comparaison de la qualité de préservation de tissus nerveux en cryofixation à différents endroits du tissu.

En cryofixation on peut observer une excellente comme une mauvaise préservation des membranes (A1-A2), des mitochondries (B1-B2) et de l'enveloppe nucléaire (C1-C2) en fonction de la profondeur dans le tissu. (Adaptée de Möbius et al., 2010).

#### I.D. L'immuno-localisation en microscopie électronique

La microscopie électronique permet également la localisation de protéines par immunomarquage. Cette technique repose sur le même paradigme que l'immunofluorescence c'est-à-dire l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre une protéine d'intérêt. La principale différence est que les anticorps secondaires sont conjugués à une particule d'or colloïdal ou une peroxydase pour produire un signal dense aux électrons et non pas à un fluorochrome.

Une des complexités de la technique est qu'une forte fixation de l'échantillon est nécessaire pour une préparation conventionnelle en ME, elle est généralement obtenue par au moins 2% de glutaraldéhyde et une telle condition n'est pas compatible avec la préservation de l'antigénicité. De plus l'utilisation de tétraoxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) est également un inconvénient pour l'immunomarquage, car avec sa haute réactivité,

## INTRODUCTION

l'OsO<sub>4</sub> réduit l'antigénicité. Pour surmonter ce problème, plusieurs stratégies ont été développées.

L'une d'entre elles repose sur la fixation de l'échantillon avec du paraformaldéhyde, suivi d'une étape de cryo-protection dans du sucrose et la congélation de l'échantillon. Il est ensuite possible de découper des sections ultrafines à l'aide d'un ultra-cryo-microtome. Les sections sont ensuite recueillies sur une grille EM et traitées pour l'immunomarquage. Cette technique est appelée immunomarquage Tokuyasu (pour le protocole complet, voir : Möbius and Posthuma, 2019).

Il existe une autre méthode, l'immunomarquage post-embedding, pour laquelle l'immunomarquage est effectué une fois l'échantillon en résine. Plusieurs approches sont utilisées, une première consiste à préparer le tissu de la même manière que pour la ME conventionnelle cependant l'échantillon est placé dans une résine hydrophile pour préserver l'antigénicité du tissu. Cette première méthode donne de bons résultats en termes de marquage, mais avec une préservation de l'ultrastructure du tissu inférieure à l'utilisation de résine hydrophobique classique comme l'époxy (Kann et Fouquet 1989). Une seconde approche consiste à utiliser une préparation conventionnelle pour la microscopie électronique, mais sans osmification. Pour ce faire, l'osmium est remplacé par une combinaison d'acétate d'uranyle et d'acide tannique. L'échantillon est ensuite déshydraté et mis en bloc dans une résine époxy de façon classique (Phend, Rustioni, et Weinberg 1995). L'immunomarquage dans les deux cas est réalisé à la fin de ce processus et donc à lieu directement sur la coupe ultrafine.

La dernière consiste à immuno-marquer l'échantillon avant la préparation de l'échantillon pour la microscopie électronique. Dans cette dernière méthode, on peut donc préserver l'antigénicité du tissu en adaptant les premières étapes de fixations. Cela consiste donc, en premier lieu, à utiliser le paraformaldéhyde au lieu du glutaraldéhyde pour préserver l'antigénicité de l'échantillon. Il est aussi important ici de chercher à préserver de manière optimale l'ultrastructure des tissus, la concentration de cet aldéhyde devra donc être ajustée pour éviter une forte augmentation de l'osmolarité de la solution (Goldberg 2008). Le tissu est ensuite traité pour l'immunomarquage avec des protocoles similaires à ceux utilisés pour

l'immunofluorescence. Cependant, le pré-enrobage (ou pré-embedding), comparé aux autres techniques, présente un problème majeur : la pénétration des anticorps. Ce problème a été résolu par le développement d'anticorps Fab' avec un conjugué d'or colloïdal extrêmement petit (1,4 nm) suivi d'une procédure d'amplification du signal à l'argent (Tao-Cheng et al. 2021).

Le protocole de Tokuyasu convient à la préparation d'échantillons immunomarqués pour la MET et la ET, mais leur faible contraste peut compliquer leurs interprétations. On peut par exemple observer que sur un immunomarquage avec la technique de Tokuyasu de la protéine V-Glut-1 qui est une protéine présente communément au niveau de l'enveloppe des vésicules synaptiques, une synapse est facilement discernable, cependant les membranes des vésicules et le reste du tissu environnement sont peu résolus (Figure 6, I-A-B). Les protocoles de post-enrobages quant à eux permettent une bonne préservation de l'ultrastructure du tissu, mais présentent le désavantage de ne pas produire un niveau de marquage aussi élevé que le pré-enrobage. On peut observer que pour un marquage de la GFAP ([voir section II.I.B](#)) qui est une protéine exprimée par les astrocytes, on observera un plus proéminent marquage dans les prolongements astrocytaires en pré-enrobage en comparaison du post-enrobage (Figure I-6, C-D) (Jones 2016). Le pré-enrobage offre d'ailleurs la possibilité de marquer plusieurs protéines sur le même échantillon en faisant varier les temps d'incubation avec l'argent. La variation de ce temps d'incubation permet la variation de la taille des particules constituées d'or et d'argent. On peut l'observer par exemple sur un double marquage effectué en pré-enrobage ciblant la GFAP et la synaptophysine. On peut remarquer des particules larges au niveau des synapses représentant la synaptophysine et de plus petites particules au niveau des prolongements astrocytaires représentant le marquage de la GFAP (Figure I-6,D) (Yi et al. 2001).

## INTRODUCTION

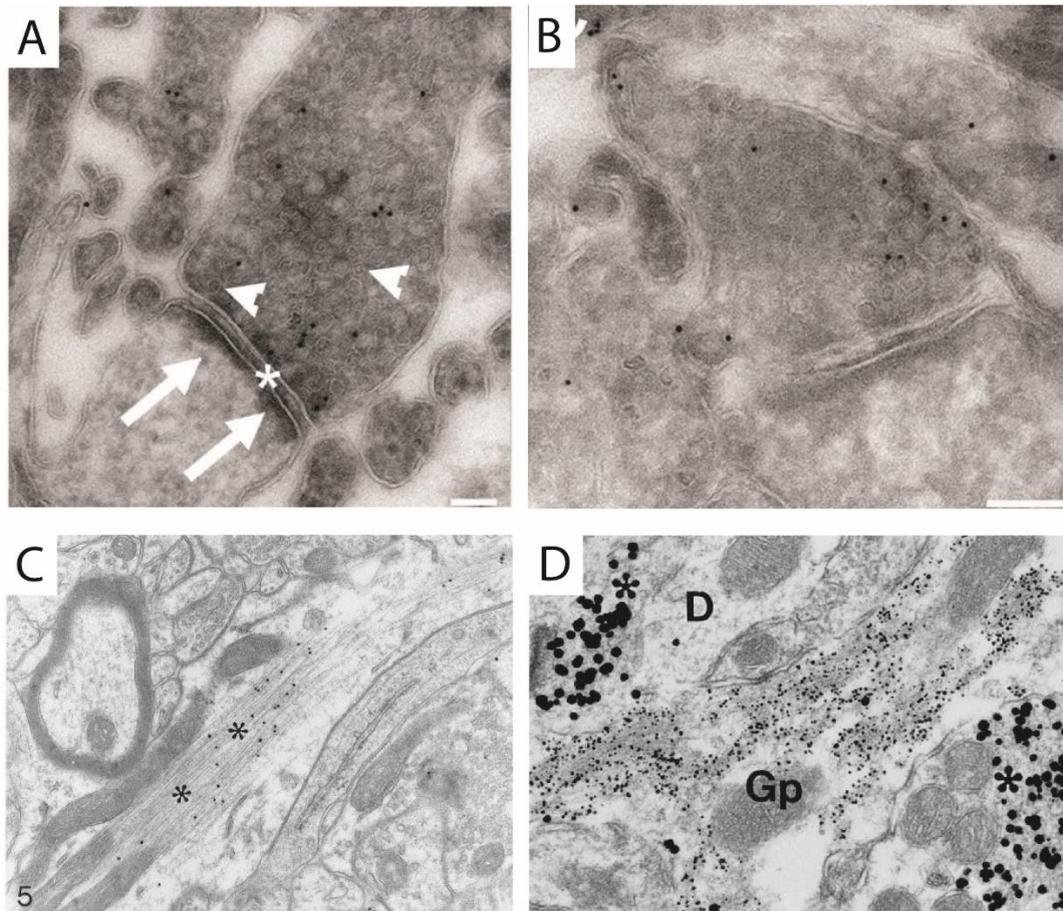


Figure I-6: Image représentative des différents types d'immunomarquages obtenus suite à l'application des protocoles de Tokuyasu, Post-embedding et préembedding.

(A-B) Image TEM obtenue après immunomarquage avec le protocole de Tokuyasu de la protéine V-Glut1. On observe une synapse contenant des vésicules synaptiques (têtes de flèche) au niveau du bouton présynaptique, la fente synaptique (astérisque) et les densités post-synaptiques (flèches) au niveau de l'épine dendritique. (C) Image TEM d'un marquage « Post-embedding » de la protéine astrocytaire GFAP. On peut remarquer le réseau de filament intermédiaire (astérisques) marqué par les anticorps conjugués à l'or. (D) Image TEM d'un double marquage des protéines GFAP et Synaptophysine par « Pre-embedding ». (Barre d'échelle : A = ; B = ; D = 210 nm). (Modifiées de Hajós and Halasy, 1998; Loussert Fonta et al., 2015; Yi et al., 2001).

## II. L'analyse d'image en 3D

Un des défis techniques de l'imagerie 3D en microscopie est l'analyse des images. En effet, pour pouvoir extraire des données quantitatives, les images obtenues doivent être segmentées. La segmentation correspond à la division des images obtenues en sous-ensembles représentant des objets différents et/ou, en biologie cellulaire, des unités cellulaires différentes. En neurosciences, la segmentation permet par exemple la séparation des neurones, astrocytes et autres cellules, mais aussi leurs compartiments intracellulaires tels que les mitochondries, vésicules synaptiques ou le réticulum endoplasmique. Cette étape de segmentation représente le facteur limitant pour l'analyse des données obtenues avec cette technique, tout particulièrement pour l'étude de la connectomique qui repose sur l'observation anatomique du système nerveux central à grande échelle pour identifier les interactions neuronales. Pendant longtemps, la segmentation des données a été réalisée de façon manuelle sur des logiciels du type de IMOD, Microscopy image Browser (MIB ; Belevich et al., 2016) ou le plug-in de Fiji TrakEM2 (Cardona et al. 2012) pour n'en citer que trois des plus utilisés. Cependant, cette segmentation est manuelle, elle repose sur le dessin image par image des contours ou de l'intérieur des éléments cellulaires. Il s'agit donc d'un processus très long qui n'est pas en adéquation pour l'analyse de larges sets de données. Cette approche n'est qu'un pis-aller pour les larges sets de données en microscopie électronique, car la reconstruction d'un neurone à la suite d'une acquisition en ME 3D prend 100 fois plus de temps qu'une reconstruction effectuée à partir d'image de microscopie optique (Helmstaedter, Briggman, et Denk 2008).

Une automatisation complète de la segmentation permettrait une exploitation complète des sets de données obtenus grâce aux techniques récentes de microscopie électronique. Bien qu'à l'heure actuelle, et depuis une dizaine d'années grâce au développement des réseaux de neurones en analyse d'image, ces méthodes de segmentations commencent à être possibles, elles nécessitent encore énormément de corrections après traitement. Les méthodes de deep learning ont permis la segmentation de larges sets de données issues de la tomographie à rayon X permettant la reconstruction de faisceau de nerf chez la drosophile ou même de l'organisation du cortex chez la souris (Kuan et al. 2020). De façon d'autant plus impressionnante, ces

## INTRODUCTION

réseaux ont permis la production de larges connectomes chez la drosophile (Scheffer et al. 2020). De plus, quand bien même la démonstration de faisabilité fut faite sur un set de donnée, elle n'est pas souvent reproductible sur d'autres sets de données, même très peu différents. Pour entraîner un réseau de neurones, il est toujours nécessaire de produire une carte de segmentation permettant l'entraînement de ce dernier. Cependant pour obtenir ces cartes, il faut passer par une autre méthode de segmentation.

L'apparition des modèles interactifs a permis d'accélérer le processus de segmentation. Ces modèles reposent sur un système de marqueurs, qui, propagé dans l'image, va permettre le « remplissage » des structures cibles. Dans cette introduction, nous ne parlerons que des algorithmes reposant sur le « watershed » ou « ligne de partage des eaux en français », car ce fut ceux utilisés pour ce travail de thèse. Ces algorithmes sont parfaitement adaptés pour la segmentation d'images en niveau de gris comme celle obtenue en ME. En premiers lieux, les données obtenues en microscopie électronique doivent être traitées pour interpréter les nuances de gris en reliefs afin de pouvoir former une « carte de contour ». Ensuite, un filtrage de l'image permettant de lisser les structures, plus typiquement les filtres gaussiens, est utilisé pour préparer l'image à la segmentation. Pour faire simple, les courbes de niveau de gris sont interprétées comme des reliefs topographiques (Figure I-7, A). Ces reliefs seront par la suite inondés à partir de marqueurs (Figure I-7, A/B/C) jusqu'à se rencontrer, définissant alors les lignes de partage des eaux (Figure I-7, D). L'inondation se propage donc de proche en proche, de voxel adjacent à voxel adjacent. Pour accélérer ce processus, les images peuvent être modifiées en agglomérant des voxels supposés représenter les mêmes structures donc ayant des niveaux de gris similaires pour former des supervoxels. L'inondation se produira dorénavant de supervoxels en supervoxels permettant la diminution du temps de calcul grâce à la diminution du nombre d'opérations nécessaire.

Une application intéressante de ce type d'algorithme fut implémentée dans le logiciel open source Ilastik. Le module carving d'ilastik repose sur cette tâche et l'établissement au préalable d'une carte de supervoxel permettant l'accélération du processus d'inondation (Straehle et al. 2011). L'utilisateur d'Ilastik peut directement interagir

avec le set de données à segmenter en définissant, marqueur par marqueur, l'intérieur et l'extérieur de l'objet à segmenter. Malgré la nécessité de répéter de nombreuses fois l'opération pour effectuer des segmentations complexes, ce logiciel a été utilisé avec succès pour la segmentation de l'astrocyte (Cali et al. 2016 ; Vezzoli et al. 2020). Après un certain nombre d'itérations, on peut obtenir des segmentations précises d'élément

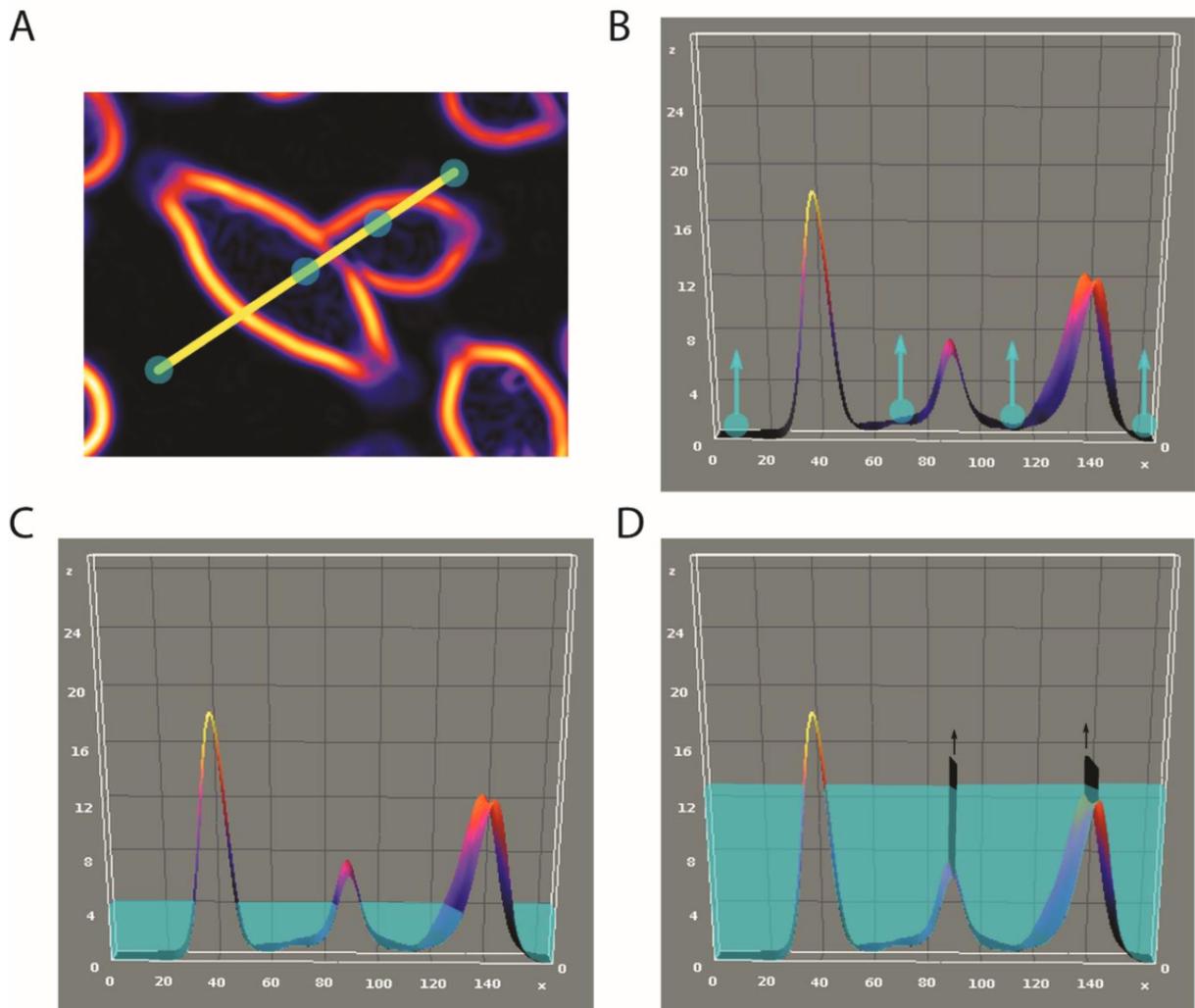


Figure I-7 : La segmentation basée sur le watershed.

(A) Image modifiée de cellules en culture montrant les nuances de gris en couleurs. La palette de gris variant du noir pour les valeurs les plus élevées (blanc) au jaune clair pour les valeurs les plus faibles (noir). (B) Représentation graphique de la topologie de l'image (A) interprétée par les nuances de gris long de l'axe jaune dessiné sur l'image (A). Chaque point bleu représente un marqueur. (C) L'inondation se fait progressivement jusqu'à ce qu'elles se rejoignent (D), une digue est alors formée permettant la ségrégation des différents éléments.

## INTRODUCTION

du neuropile, comme l'astrocyte, des synapses et dendrites, mais aussi les éléments intracellulaires comme la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Figure I-8, A).

Cependant, les difficultés de l'analyse d'image 3D ne s'arrêtent pas là. Une fois les objets segmentés, il est temps d'extraire de ces reconstructions des informations quantitatives permettant de mieux comprendre l'organisation et le fonctionnement des cellules au sein du tissu. Il sera possible de représenter ces objets sous forme de « maillage » (Figure I-8, A/B) ou d'extraire les cartes de segmentation représentant les objets segmentés sous forme de pile d'images binaires en niveau de gris où chaque valeur de gris identifie un élément. Les maillages sont extrêmement pratiques pour la visualisation et la représentation des structures avec un logiciel de rendu 3D, comme ceux utilisés dans le monde du jeu vidéo, mais ces maillages peuvent aussi être utilisés pour procéder à des analyses quantitatives. Les opérations de calcul sur les maillages restent cependant très longues pour effectuer des analyses précises et systématiques sur des volumes très larges avec une très haute résolution.

Finalement, les facteurs les plus importants pour réaliser les opérations de traitements d'image pour obtenir des résultats quantitatifs sont les ressources de calculs disponibles pour l'opérateur. Avec l'évolution des techniques en microscopies électroniques, l'acquisition de larges sets de données à haute résolution devient chose commune, mais chaque étape de l'analyse peut être limitée par ces ressources. Par exemple, la segmentation semi-automatique présentée dans cette introduction peut être difficilement réalisée sur des données d'un volume supérieur à  $60 \text{ um}^3$ , car le temps de calcul de chaque opération de segmentation augmente proportionnellement au volume de donnée utilisé.

Nous avons donc vu les modalités de l'imagerie 3D en microscopies électroniques, ses limitations et quelques possibles applications dans les domaines des neurosciences. Nous allons voir dans les prochaines sections l'astrocyte, ses rôles dans la physiologie du système nerveux central et ses particularités, montrant ainsi le besoin des études en microscopie électronique pour révéler une part des mystères de cette cellule très complexe.

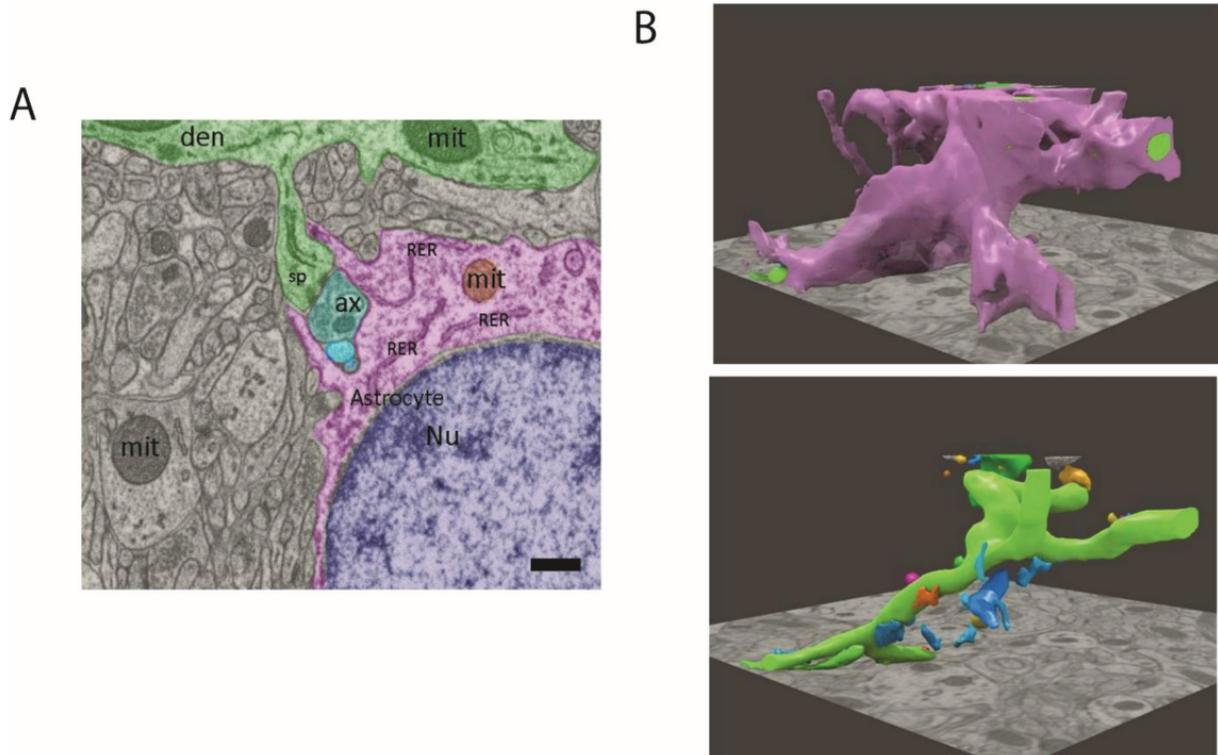


Figure I-8 : Segmentation du neuropile et modélisation 3D

(A) Image 2D issue d'un stock d'images obtenue en FIB/SEM du neuropile du gyrus denté de la souris et un overlay de segmentation des objets dans cette image. On peut y observer un fragment d'astrocyte (Rose), le noyau de l'astrocyte (Violet), une dendrite et une épine dendritique notée « sp » (Vert) ainsi qu'une terminaison axonale (ax, Bleu). (B) Maillage 3D des éléments segmentés dans l'image (E). Le panneau du haut montre l'astrocyte et sa membrane couvrant les éléments intracellulaires tandis que l'on peut observer les éléments intracellulaires dans le panneau du bas grâce à la transparence de la membrane de l'astrocyte.



## Chapitre II: L'Astrocyte une cellule aux nombreuses fonctions

### I. Généralité

#### I.A. Histoire d'une découverte

Les astrocytes sont des cellules spécifiques du système nerveux central (SNC). En 1846 Virchow décrit pour la première fois ces cellules comme une « colle », une « glu », qui lie les éléments du tissu nerveux, il décida par conséquent de les nommer : Neuroglie (Figure II-1, A) (Quincozes-Santos et al., 2021 ; Virchow, 1858). Par la suite, Camillo Golgi, grâce à une coloration au chromate d'argent, fit la description de nombreuses cellules au sein du tissu nerveux, notamment celles différentes des neurones qui furent décrites comme constituant de cette névroglie (Figure II-1,B) (Camilio Golgi 1870). Finalement, la dénomination d'astrocytes leur fut attribuée par Michael von Lenhossek, à cause de la forme d'étoile de leurs prolongements membranaires formés autour du soma (Lenhossék 1893).

Au cours du XXème siècle, Ramon y Cajal développa une méthode pour étudier spécifiquement les astrocytes à l'aide de Chlorure de mercure qui marque spécifiquement la protéine acide fibrillaire (de l'anglais Glial Fibrillary acidic protéine ou GFAP), malgré qu'il n'en eût pas conscience à l'époque, qui est une protéine essentiellement exprimée dans les astrocytes (Figure II-1, C). Bien que par manque d'études et de données les astrocytes ne semblaient pas avoir de fonction évidente, Golgi a pour la première fois proposé la « Théorie de la nutrition » faisant l'hypothèse que les astrocytes ont avant tout un rôle trophique (Camilio Golgi 1903). Par la suite, Cajal fit l'hypothèse que les astrocytes ont un rôle d'isolant entre les différents neurones, il proposa aussi un rôle dans la régulation du flux sanguin à cause de leurs interactions avec les vaisseaux sanguins (Navarrete et Araque 2014).

#### I.B. L'identification des astrocytes

Comme décrit précédemment, les astrocytes ont tout d'abord été identifiés sur la base de critères morphologiques ; puis, grâce aux travaux de Ramon y Cajal, par marquage de la GFAP, bien qu'il n'eût pas conscience de la nature de cette protéine qu'il marquait à l'époque. Avec l'évolution des techniques de microscopie optique et le développement

## INTRODUCTION

de stratégies d'immunomarquage, un nouveau pas a été franchi dans l'identification de ces cellules. En particulier, le marquage de la GFAP (Figure II-1, D-F) a été extensivement utilisé pour décrire morphologiquement les astrocytes et les identifier. Cependant, la GFAP ne semble pas être le meilleur marqueur astrocytaire, car il est exprimé très tard dans le développement et ne permet donc pas de marquer toutes les populations d'astrocytes. De plus, la GFAP faisant partie du cytosquelette de l'astrocyte, le marquage de cette protéine ne permet que l'observation de 10% du volume de la cellule. Plus récemment, des études transcriptomes ont permis d'identifier de nouveaux marqueurs plus ubiquitaires. Par exemple, on trouve des protéines du cytosquelette comme la vimentine, des protéines se liant au calcium pour réguler les fonctions cellulaires comme S100 bêta (Figure II-1, E-F), des protéines du métabolisme cellulaire tel que ALDH1L1. On trouve aussi des transporteurs au glutamate tels que : EAAT-1 (GLAST), EAAT-2 (GLT-1), mais aussi des protéines impliquées dans le métabolisme du glutamate comme la Glutamine synthase. S100 bêta et ALDH1L1 sont des protéines cytosoliques, par conséquent, dû à leur répartition large dans la cellule elles sont idéals pour observer l'ensemble de la morphologie astrocytaire. Il y a aussi certaines connexines permettant le maintien des interactions entre astrocytes comme : CX43 et CX30 ou une aquaporine comme AQP4 et un facteur de transcription SOX9. Toutes ces protéines peuvent être utilisées pour marquer les astrocytes, cependant aucune d'entre elles n'est universelle. Leurs localisations spécifiques doivent être considérées quand ces marquages sont utilisés en fonction de l'objet précis de l'observation. Par exemple il serait logique d'utiliser un marquage AQP4 pour l'étude des pieds astrocytaires ([voir section II.IV.A](#)) On constate d'ailleurs que selon les conditions, le marquage de la GFAP ne coïncide pas avec le marquage de S100 bêta au sein de l'astrocyte (Figure II-1, E-F ; McDougal et al., 2011)

En microscopie électronique, l'identification des astrocytes se fait sur des critères morphologiques. Typiquement, les astrocytes sont caractérisés par les propriétés suivantes : un cytoplasme pâle contenant des densités électroniques éparses, leur noyau présente des portions fines d'hétérochromatine, des contours membranaires irréguliers formant des angles obtus au travers du neuropile et des contacts directs avec les éléments neuronaux (épines, dendrites, axones, fentes synaptiques, corps

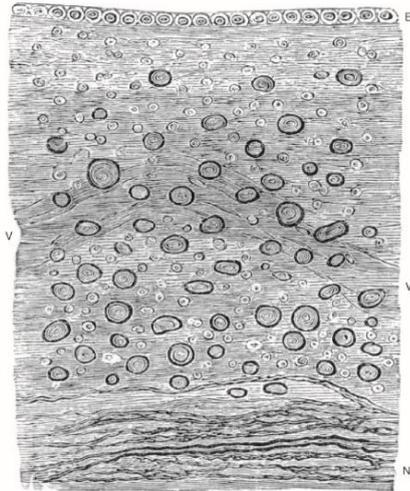
## Chapitre II – L'astrocyte une cellule aux nombreuses fonctions

cellulaires). Ils sont très différents des neurones qui eux présentent un noyau euchromatique rond et de grandes tailles avec de petites taches sous l'enveloppe nucléaire, des pores nucléaires abondants et un, ou des, nucléole(s) bien distinct(s). Le péricaryon présente des citernes de RE longues et aplaties, entourées de ribosomes et de polyribosomes libres, de neurofilaments, de microtubules et de corps multi vésiculaires. Il présente plusieurs types de processus et de sous-domaines qui ont été largement décrits à l'aide de la ME : dendrites, épines, filopodes, axones, synapses (terminaisons axoniques, épines, fentes synaptiques).

On peut aussi clairement distinguer les astrocytes des cellules microgliales qui sont de petites cellules avec un anneau de cytoplasme sombre très fin. Ces dernières forment de nombreux contacts avec les autres cellules gliales et présentent des inclusions cellulaires telles que de grandes vésicules contenant des éléments provenant de types cellulaires différents dû à leur activité de phagocytose (figure II-1, I). On ne peut pas non plus confondre les astrocytes avec les oligodendrocytes qui eux présentent un noyau à motifs d'hétérochromatines très hétérogène et un cytoplasme sombre. Leur péricaryon prend souvent une forme proche de rectangles ou du carré. (Figure II-1, H) (Nahirney et Tremblay 2021).

# INTRODUCTION

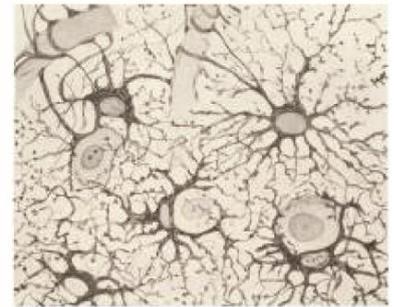
A



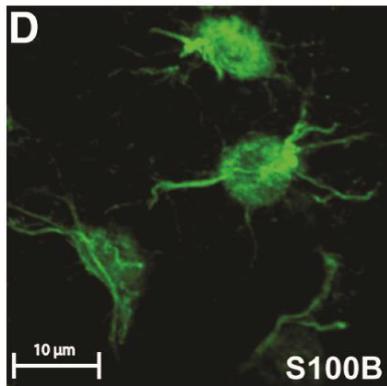
B



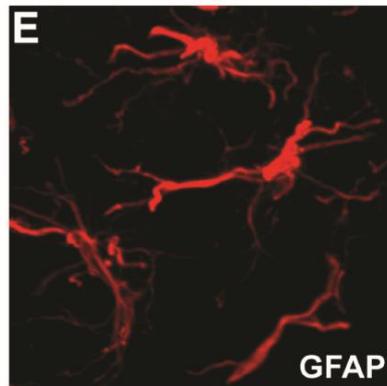
C



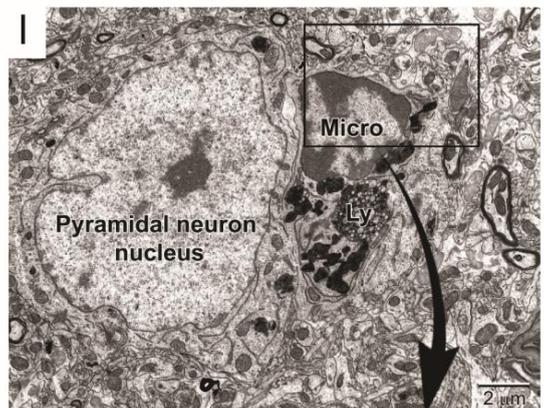
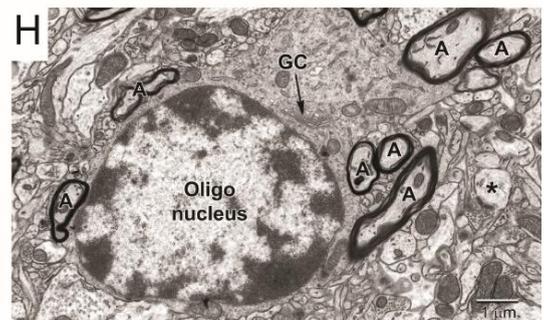
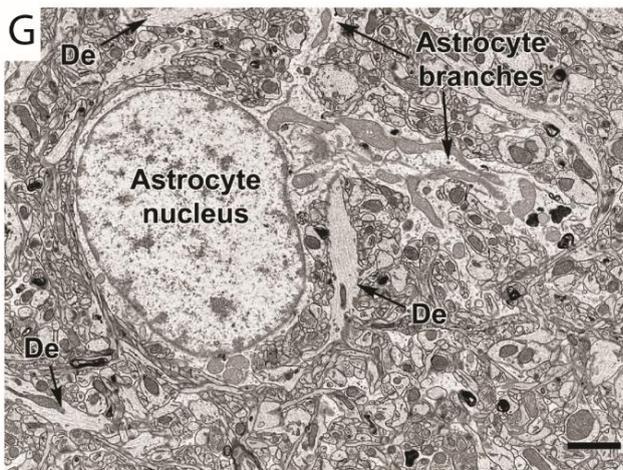
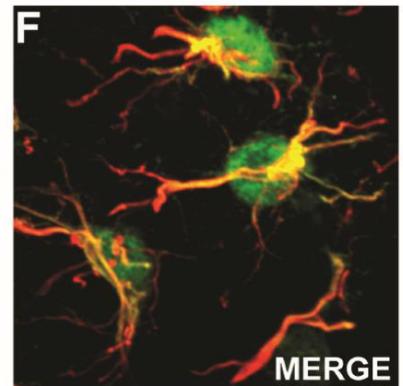
D



E



F



## Chapitre II – L'astrocyte une cellule aux nombreuses fonctions

Figure II-1 : Identification des astrocytes en microscopie optique et en microscopie électronique.

(A) Neuroglie dessinée par Rudolf Virchow. Le dessin représente une observation de l'épendyme du quatrième ventricule. Entre les épendymocytes et les fibres nerveuses, on peut observer une partie du tissu constitué de neuroglies. Abréviations : E = Ependymocytes ; N = Fibres nerveuses and V = Vaisseaux sanguins. (B) Dessin réalisé par Camillio Golgi suite à ses observations d'astrocytes en contact avec les vaisseaux sanguins. (C) Dessin réalisé par Ramon y Cajal des astrocytes marqués à l'aide du Chlorure de mercure. (D-F) Image d'immunofluorescence avec des marqueurs spécifiques de populations astrocytaires. (D) Astrocytes marqués avec un anticorps anti-SR100 bêta. (E) Astrocytes marqués avec un anticorps anti-GFAP. (F) Superposition des deux marquages astrocytaires. (G) Image TEM d'un astrocyte et de ses prolongements cytoplasmiques (branches) dans le tissu nerveux. Abréviations : D = Dendrites. (H) Image TEM d'un oligodendrocyte entouré d'axones myélinisés au sein du tissu nerveux. Abréviations : À = axones (I) Image TEM montrant le corps cellulaire d'un neurone pyramidal et une microglie au sein du tissu nerveux. Abréviations : Micro = Microglie ; Ly = Lysosome. (Modifiées de Kettenmann and Verkhratsky, 2008 ; McDougal et al., 2011 ; Parpura and Verkhratsky, 2012)

### II. Une cellule singulière au sein du système nerveux central

#### II.A. Le ratio neurones/astrocytes

Les astrocytes sont donc des cellules du CNS faisant partie de la famille des cellules gliales qui comportent : les microglies, les oligodendrocytes et les astrocytes. Bien que le nombre de cellules gliales reste variable en fonction des différentes régions du système nerveux central, on estime que chez l'homme on trouve de 1.2 à 1.6 fois plus de cellules gliales que de neurones (Herculano-Houzel 2009). Il fallut du temps aux neuroscientifiques pour déterminer le nombre de cellules gliales dans le cerveau tout en les dissociant proprement. L'évolution des techniques de microscopie et la découverte de marqueurs spécifiques pour les astrocytes (GFAP, SR100 beta) et pour les autres cellules gliales ont permis cette discrimination et leur comptage. On estime désormais que les astrocytes représentent entre 20 à 40 % des cellules gliales. Chez l'humain on peut donc considérer que cela représentera environ 10 à 20% des cellules du SNC (Verkhratsky et Nedergaard 2018).

## INTRODUCTION

### II.B. La diversité des populations astrocytaires

Les astrocytes sont originaires des mêmes cellules progénitrices que les neurones. Ces cellules sont appelées glie radiaire et sont les cellules multipotentes majoritaires du cerveau. Au début du développement, les glias radiaires vont produire : soit des progéniteurs intermédiaires qui vont pouvoir produire des neurones ou des astrocytes, soit directement se différencier en astrocytes.

Les astrocytes partagent la même forme ramifiée, cependant ils disposent aussi d'une certaine hétérogénéité. Jusqu'à neuf types d'astrocytes morphologiquement différents ont été décrits à ce jour. Certains types sont très spécifiques comme la cellule gliale de Müller ou de Bergmann que l'on trouve respectivement dans la rétine et le cervelet des vertébrés; d'autres sont plus généralement présents dans le SNC comme les astrocytes protoplasmiques et les astrocytes fibreux (Emsley et Macklis 2006). Les astrocytes fibreux sont essentiellement présents dans la substance blanche au contact des fibres nerveuses myélinisées ; ils possèdent de longs prolongements cytoplasmiques bien moins ramifiés que ceux des astrocytes protoplasmiques que l'on trouve majoritairement dans la substance grise. Les astrocytes protoplasmiques sont cependant les plus abondants. Ces astrocytes protoplasmiques peuvent occuper un territoire de 80 000  $\mu\text{m}^3$  et dans le cortex ils peuvent être au contact avec des milliers de synapses, jusqu'à 120 000 synapses chez le rongeur (Halassa et al. 2007).

La diversité des astrocytes ne s'arrête pas à leur morphologie. Les analyses du transcriptome et du protéome des astrocytes dans différentes régions du cerveau ont démontré une incroyable diversité intercellulaire, mais aussi intracellulaire. Cette diversité, suggérant une fonctionnalité différente des astrocytes en fonction de leurs environnements, mais aussi une spécialisation de leurs fonctions entre les différentes régions du SNC (Oberheim, Goldman, et Nedergaard 2012). Il est important de noter que les astrocytes en culture ne semblent pas avoir les mêmes phénotypes, ce qui souligne encore l'influence de l'environnement tissulaire sur le développement astrocytaire (Reichenbach, Derouiche, et Kirchhoff 2010).

Enfin, les astrocytes peuvent changer de caractéristiques en fonction des conditions environnementales au sein du tissu. Les astrocytes en cas d'inflammation vont exercer un rôle important au sein du SNC ([voir section III.A.](#)). Ces astrocytes vont subir une

hypertrophie accompagnée d'une augmentation d'expression de protéines dont la GFAP. Ces astrocytes sont caractérisés d'astrocytes réactifs.

### II.C. Le territoire astrocytaire et réseau astrocytaire

Les astrocytes sont des cellules hétérogènes qui couvrent un large territoire qui ne semble se rencontrer qu'à l'extrémité de leur prolongement cytoplasmique. En effet, bien que les territoires astrocytaires ne se superposent que très peu, il semblerait que ces cellules forment un réseau fonctionnel au sein du neuropile. Le couplage astrocytaire a été démontré pour la première fois grâce à l'injection de Luciferase jaune ou de biocytine dans un seul astrocyte, il a alors été observé une diffusion du marqueur qui a entraîné le marquage de nombreux astrocytes autour de celui injecté. Ce phénomène est rendu possible par l'existence de jonctions communicantes au point de contact entre les astrocytes. Ces jonctions sont composées de protéines comme la connexine 30 (Cx30) et la connexine 43 (Cx43) qui forment des héli-canaux par la liaison de six sous-unités au niveau de chaque astrocyte. Ces deux héli-canaux par leurs interactions forment un canal permettant le transport de molécules intercellulaires de tailles inférieures à 1,2 kDa, d'eau et d'ions. Il a été estimé que les membranes de deux astrocytes en contact laissent un espace intercellulaire d'environ 2-3 nm (Basheer et Shaw 2016; Giaume et al. 2010). En fonction de la région, on peut retrouver des centaines de cellules en contact ou alors seulement entre 2 et 5 cellules et le couplage entre deux astrocytes n'est pas toujours obligatoire, que leur territoire se superpose ou non (Hirase et al., 2004; Kuga et al., 2011). De plus, les connexions entre astrocytes sont hautement plastiques et dépendantes de l'activité synaptique (pour revue Pannasch et Rouach 2013). On sait qu'environ 25 % des contacts formés grâce aux jonctions communicantes dans l'astrocyte permettent la connexion de prolongement cytoplasmique provenant de la même cellule (Rohlmann et Wolff 1996).

### II.D. La signature électrophysiologique des astrocytes

Les astrocytes sont généralement considérés comme des cellules hyperpolarisées avec un potentiel de membrane d'environ -80 mV. Leurs membranes sont extrêmement perméables aux ions K<sup>+</sup>, il se peut donc que les astrocytes servent de tampon local pour « éponger » les ions potassium libérés lors de la dépolarisation des neurones. Bien que les astrocytes montrent une véritable diversité de phénotype, comme décrit plus haut,

## INTRODUCTION

il semblerait qu'ils aient des propriétés électrophysiologiques très homogènes au sein du SNC (Mishima et Hirase 2010). Contrairement aux neurones, les astrocytes ne sont pas considérés comme des cellules électriquement excitables, mais certaines études ont cependant mesuré des phénomènes de dépolarisation des astrocytes en lien avec des activités neuronales spécifiques (Deemyad, Lüthi, et Spruston 2018). Bien que ces observations existent, elles restent pour le moment marginales et sont limitées à l'étude du corps cellulaire de l'astrocyte. Le consensus dans la communauté scientifique étant que l'activité des astrocytes se traduit essentiellement par la signalisation calcique, cette signalisation sera développée dans le prochain chapitre ([Chapitre III](#)).

### II.E. L'astrocyte, une morphologie particulièrement complexe

Nous l'avons vu, l'astrocyte est une cellule très large qui possède de nombreux prolongements cytoplasmiques. Ces prolongements traversent le neuropile et entrent en contact avec de nombreuses structures au sein du tissu. Une observation générale de ces cellules permet de décrire différentes régions fonctionnelles. En premier lieu, on trouve le corps cellulaire qui contient le noyau et du réticulum endoplasmique, des mitochondries et l'appareil de Golgi. Le corps cellulaire de l'astrocyte n'est pas spécialement plus large que celui des neurones pyramidaux.

Une façon de caractériser les domaines astrocytaires en microscopie optique est de décrire l'ensemble des prolongements les plus larges de l'astrocyte qui ont un diamètre supérieur à la limite de séparation en microscopie optique comme le « core » composée de prolongements cytoplasmiques larges et du corps cellulaire de l'astrocyte. Les autres prolongements fins sont considérés comme le domaine spongiforme, ou « gliapile », ce domaine est complexe et requiert des techniques de microscopie à haute résolution pour permettre leur observation précise (Figure II-2, A) (Bindocci et al. 2017).

Pour qualifier les prolongements astrocytaires, l'usage a été d'utiliser l'analogie de l'arbre comme pour l'arborisation dendritique. On trouve donc, en liaison directe avec le corps cellulaire, de larges prolongements cytoplasmiques qui sont désignés sous le terme de « branches ». Ces dernières sont larges et facilement observables en microscopie optique. De ces prolongements majeurs vont émerger de nouveaux prolongements beaucoup plus fins et plus intriqués dans le neuropile. Certains sont

assez larges pour être observés en microscopie optique, ils ont ainsi été nommés « branchlets » pour « petite branche ». Enfin, les prolongements astrocytaires les plus distaux sont aussi les plus fins, ils émergent des branchlets, leur taille est en dessous de 200 nm de diamètre, et ils sont communément appelés leaflets pour « feuilles ou feuilletts » (Figure II-2, B) (Khakh et Sofroniew 2015).

Enfin, un dernier type de prolongement cytoplasmique ne rentre pas dans cette description. En effet, les astrocytes possèdent des extensions membranaires spécialisées qui interagissent avec les vaisseaux sanguins. Ces domaines spécialisés sont appelés les « pieds astrocytaires » et avaient déjà été décrits par Camillo Golgi et Ramon y Cajal dès les premières études de la morphologie des astrocytes. Ces pieds astrocytaires périvasculaires entourent les capillaires directement et entourent la première autour des artérioles couvrant ainsi la quasi-totalité des capillaires (Figure II-2, C/D) (Iadecola et Nedergaard 2007; Mathiesen et al. 2010) ; ils assument une fonction essentielle de l'astrocyte dans le SNC que nous allons évoquer dans les sections suivantes.

## INTRODUCTION

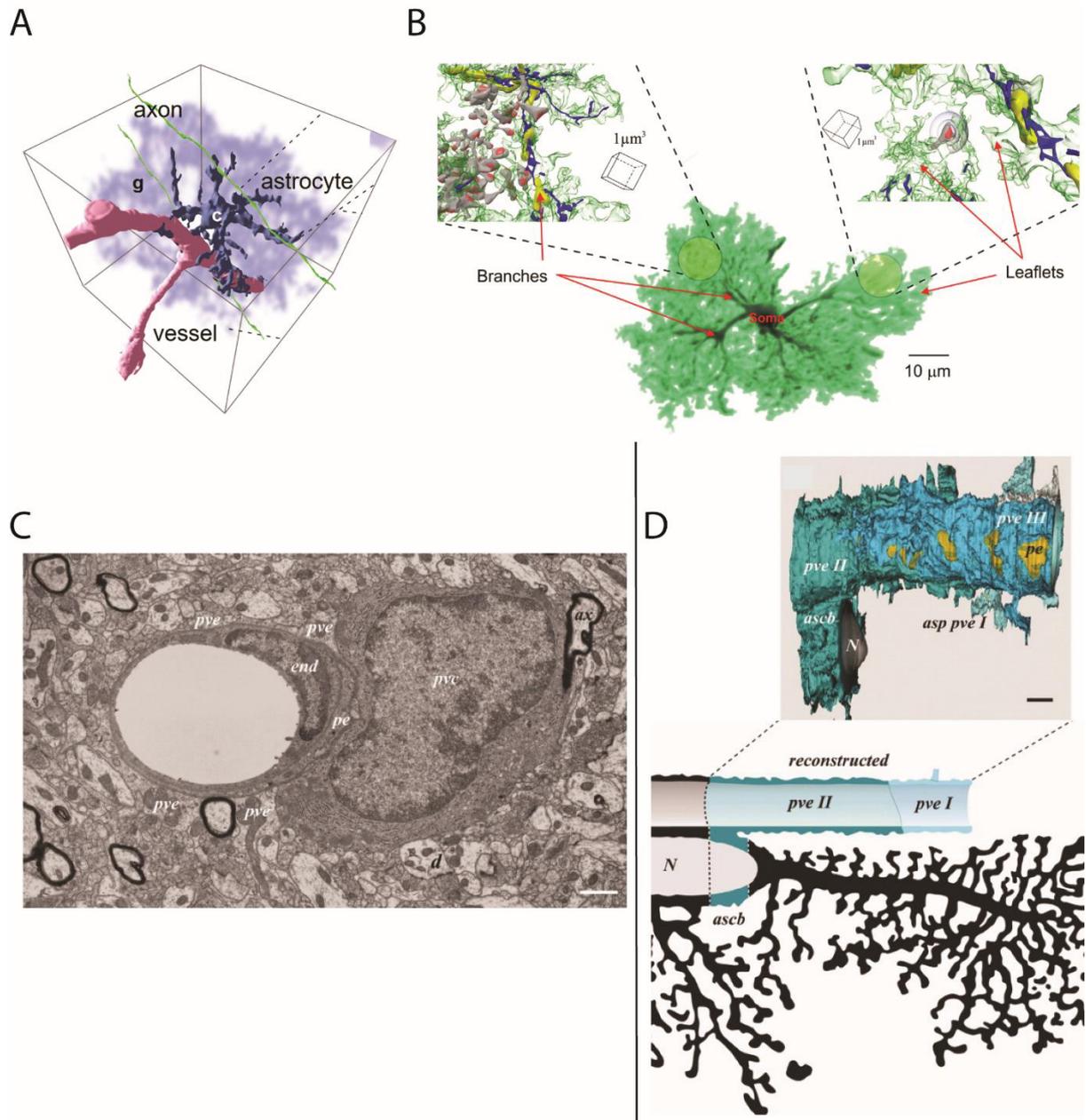


Figure II-2 : Représentations 3D de l'organisation astrocytaire.

(A) Représentation 3D de la structure astrocytaire et de ses interactions avec les axons et les vaisseaux sanguins. La structure astrocytaire pouvant être résolue est en bleu foncé et apparaît comme une structure solide, elle est annotée « c » pour « core » ; les régions non résolues apparaissent en bleu transparent et sont annotés « g » pour « gliapil ». On peut aussi observer un vaisseau sanguin contacté par l'astrocyte (rose) et deux axones (vert) (Bindocci et al. 2017). (B) Reconstruction 3D d'un astrocyte coloré avec un marqueur fluorescent (Alexa Fluor 594) dans le centre de l'image. On peut observer le soma de l'astrocyte au centre, les branches émergeant du soma et le domaine spongiforme correspondant aux parties des prolongements astrocytaires trop fins pour être résolus en microscopie

## Chapitre II – L'astrocyte une cellule aux nombreuses fonctions

optique. Deux zooms sont faits sur les domaines spongiformes montrant des reconstructions 3D obtenues à partir de coupes sériées en microscopie électronique. On observe ce qui est caractérisé comme les leaflets et les branches de l'astrocyte, la membrane de l'astrocyte étant vert transparent. On observe des branches qui contiennent des tubules de réticulum endoplasmique (Bleu) et des mitochondries (Yellow) (Semyanov and Verkhatsky, 2021). (C) Image de MET montrant les contacts entre un astrocyte et un des vaisseaux sanguins dans le stratum moléculaire de la CA1 de l'hippocampe de rat. Abréviations : Cellule endothélial (end) ; Corps cellulaire de l'astrocyte périvasculaire (pvc) ; Pieds astrocytaires périvasculaires (pve) ; Péricyte (pe) ; Axones myélinisés ou non myélinisés (ax) ; Dendrites (d). (D) Reconstruction 3D des interactions entre l'astrocyte et un capillaire. On peut voir le noyau de l'astrocyte (N) et son corps cellulaire (ascb) au contact du capillaire (pve II), mais aussi des fragments du péricyte (pe) dans les discontinuités des pieds astrocytaires l'enrobant (pve I). (Mathiisen et al., 2010).

### III. Les Interactions entre les neurones et les astrocytes

Dès les années 1970, il a été estimé que 70 à 80% de la surface membranaire de l'astrocyte correspondait à des prolongements cytoplasmiques très fins qui sont en étroites interactions avec les différents éléments du neuropile. Nombreux sont ces prolongements cytoplasmiques qui sont proches de synapses, certaines sont même totalement encapsulées par ces derniers. Il est cependant important de noter que la plupart de ces structures ne sont pas observables en microscopie optique conventionnelle (Bernardinelli, Muller, et Nikonenko 2014).

Nous allons voir dans les parties suivantes que ces interactions ne sont pas seulement morphologiques. Pour cela, nous allons introduire le concept de la synapse tripartite et les différentes fonctions de cette structure. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'organisation tissulaire de l'hippocampe et en particulier au gyrus denté qui est une région qui a été beaucoup étudiée tant d'un point de vue morphologique que fonctionnel (pour revue; Scharfman, 2011). Pour ce faire, nous nous intéresserons aux synapses glutamatergiques qui sont les principales synapses présentes dans l'hippocampe.

## INTRODUCTION

### III.A. L'hippocampe, le gyrus denté et l'astrocyte

#### III.A.1. L'organisation de l'hippocampe

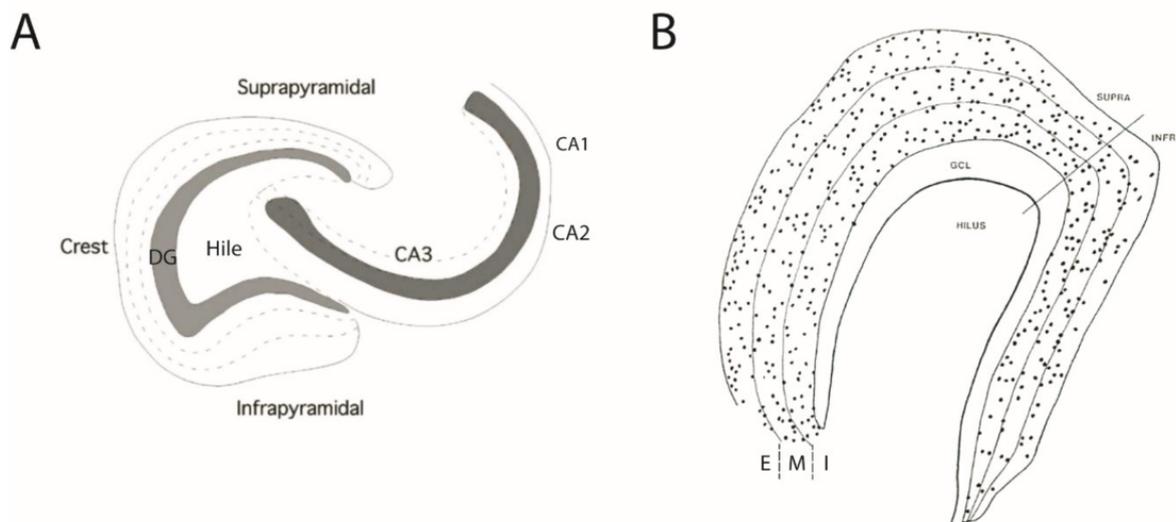


Figure II-3 : Organisation de l'hippocampe et localisation des astrocytes.

(A) Schémas représentatifs de l'organisation de l'hippocampe. DG = Gyrus denté. (B) Schémas montrant l'organisation du gyrus denté. On retrouve la division en trois couches successives de la couche moléculaire : E = externe ; M = moyenne ; I = interne. GCL = Couche Granulaire.

L'hippocampe est une structure clé du système limbique des mammifères impliquée dans différents types de mémoire tels que la mémoire épisodique, la mémoire associative et la mémoire spatiale. Cette structure est située dans le lobe temporal médian et elle est composée de trois régions principales : le cornu ammonis avec trois sous-régions nommées CA1, CA2 et CA3, le subiculum et le gyrus denté (DG) (Figure II-3, A). Le DG a été décrit comme une structure essentielle pour l'encodage de la mémoire et plus spécifiquement dans la navigation spatiale. Il a pour particularité d'être une des régions du cerveau chez les mammifères où l'on peut observer de la neurogenèse même chez l'adulte. Sur une coupe horizontale de l'hippocampe ventral chez le rat (Figure II-3, A), on peut distinguer facilement le CA et le DG. Au niveau postérieur, on trouve la crête hippocampique et le DG formant un « U » ouvert vers la face antérieure de la coupe. Au niveau de cette ouverture, on trouve le hile que l'on appellera par la suite côté interne du DG. Le « U » est formé par la couche granulaire et est suivi de la couche moléculaire. On trouve aussi entre le hile et la couche

granulaire une couche dite sous-granulaire. La couche moléculaire peut être dissociée en trois sous parties : la couche moléculaire interne (accolée à la couche granulaire), la couche moléculaire moyenne et la couche moléculaire externe (couche au contact de la fissure hippocampique). On peut subdiviser le DG en deux sous parties correspondant aux deux moitiés de ce « U ». Sur une coupe horizontale de l'hippocampe ventral chez le rat, ces deux parties sont discernables sur un axe média-latéral séparant le DG en deux moitiés symétriques : la partie infra pyramidale étant la partie médiale du DG et la partie supra pyramidale étant la partie latérale du DG faisant face à la CA1 (Figure II-3, B). La couche granulaire correspondant à la zone de maturation des nouvelles cellules produite au niveau de la couche sous granulaire. La couche granulaire est essentiellement constituée des corps cellulaires des neurones granulaires. Ces neurones sont polarisés de sorte que leurs projections axonales soient orientées dans le hile et leur arborisation dendritique dans la couche moléculaire. Les neurones granulaires reçoivent en majorité des afférences glutamatergiques provenant de la voie perforante du cortex entorhinal (Amaral, Scharfman, et Lavenex 2007).

## INTRODUCTION

### III.A.2. Les astrocytes au sein du gyrus denté

On trouve des astrocytes dans toutes les structures du gyrus denté. Les progéniteurs contenus dans la couche granulaire permettent la formation de nouveaux astrocytes au sein même du gyrus denté. En microscopie optique, il a été montré que les astrocytes de la couche moléculaire du gyrus denté occupent un territoire de 3000 à 35,000  $\mu\text{m}^3$  (Bindocci et al. 2017).

Les astrocytes de la couche moléculaire semblent être polarisés de la même façon que l'arborisation dendritique des neurones granulaires. Il se trouve que les astrocytes dont le corps cellulaire est présent dans la couche intérieure, moyenne ou externe de la couche moléculaire ont des ramifications plus grandes dirigées vers la fissure hippocampique. Tandis que seuls les astrocytes ayant leur corps cellulaire adjacent à la fente hippocampique ont des ramifications essentiellement orientées vers la couche granulaire (Figure II-4) (Bushong, Martone, et Ellisman 2003). D'une certaine

façon, il semblerait que les astrocytes de cette couche soient orientés de façon à maximiser la couverture de l'arborisation dendritique des neurones granulaires.

Dans l'hippocampe du rat, il a été observé que les dendrites, les axones et les prolongements astrocytaires sont organisés en un maillage fin que l'on appelle le neuropile. Les synapses excitatrices se trouvent principalement sur les dendrites et les épines dendritiques, tandis que les synapses inhibitrices se concentrent sur le soma cellulaire et le segment initial de l'axone, avec une distribution éparse le long des tiges

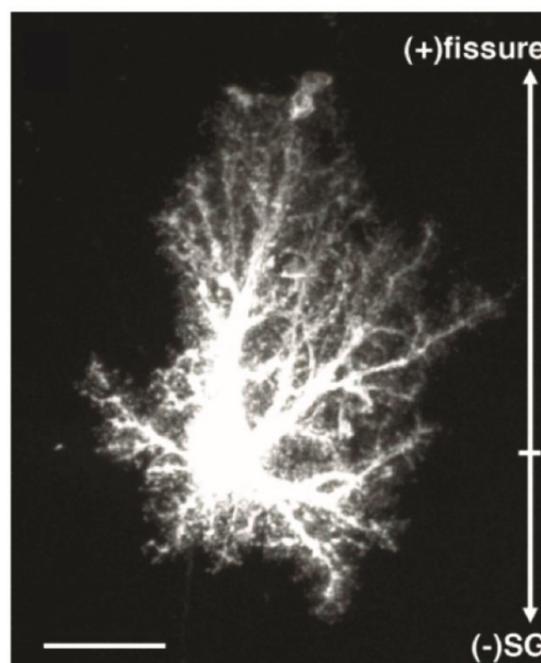


Figure II-4 : Un astrocyte du Gyrus denté

Image représentative d'un astrocyte injecté avec un marqueur fluorescent dans la couche moléculaire du gyrus denté. La couche granulaire (SG) se trouvant en bas de l'image et la fissure hippocampique en haut de l'image. On peut voir que la plupart des prolongements cytoplasmiques s'étendent vers la fissure hippocampique et non vers la couche granulaire. (Bushong, Martone, et Ellisman 2003)

dendritiques épineuses et non épineuses (K. M. Harris et Weinberg 2012). Le glutamate étant le neurotransmetteur majoritaire du SNC et du DG nous allons voir maintenant la synapse glutamatergique, sa morphologie et sa fonctionnalité.

### III.A.3. La synapse glutamatergique

Une synapse canonique est composée de trois éléments : le bouton présynaptique, la fente synaptique et l'épine dendritique. Le bouton présynaptique correspond à la terminaison d'un axone et contient typiquement des vésicules chargées en neurotransmetteurs. La fente synaptique est en réalité l'espace entre le bouton présynaptique et l'épine dendritique, dans cette espace on retrouve diverses protéines permettant la cohésion de la synapse. L'épine dendritique correspond à la terminaison d'une dendrite, elle est la composante post-synaptique de la synapse. L'épine est composée d'un cou et d'une tête plus ou moins sphérique. En microscopie électronique, on peut identifier les densités post-synaptiques (PSD), une région dense aux électrons située sous la membrane post-synaptique qui correspond à l'accumulation de protéines interagissant avec les récepteurs, mais aussi des protéines du cytosquelette (actine) et des intermédiaires métaboliques des voies de transduction (Figure II-5, A-B).

On trouve différents types morphologiques des épines dendritiques. Une classification en quatre catégories fut proposée par Peters et Kaiserman-Abramof en 1970. On y trouve les épines en forme de « champignon » qui ont une tête très large, les épines dites « fines » qui, comme leur nom l'indique, sont fines avec un long cou et une tête peu volumineuse, les épines sans cou avec une tête relativement plate et les épines « filopodiales » qui ont une forme de filopode très allongée, leurs cous étant difficiles à dissocier de leur tête (A. Peters et Kaiserman-Abramof 1970). À ce jour, on intègre aussi à cette classification des épines à plusieurs têtes (ramifiées)(Figure II-5,C)(Bosch et al. 2015).

Comme son nom l'indique, la synapse glutamatergique repose sur la libération de glutamate. Le glutamate est produit au niveau du bouton présynaptique. Il y a trois sources possibles à cette production. Il semblerait que les neurones soient incapables de produire du glutamate *de novo* (Bak, Schousboe, et Waagepetersen 2006). La première source est basée sur des mécanismes de recapture du glutamate par la synapse ou par l'astrocyte. Au niveau du bouton présynaptique, on peut retrouver des

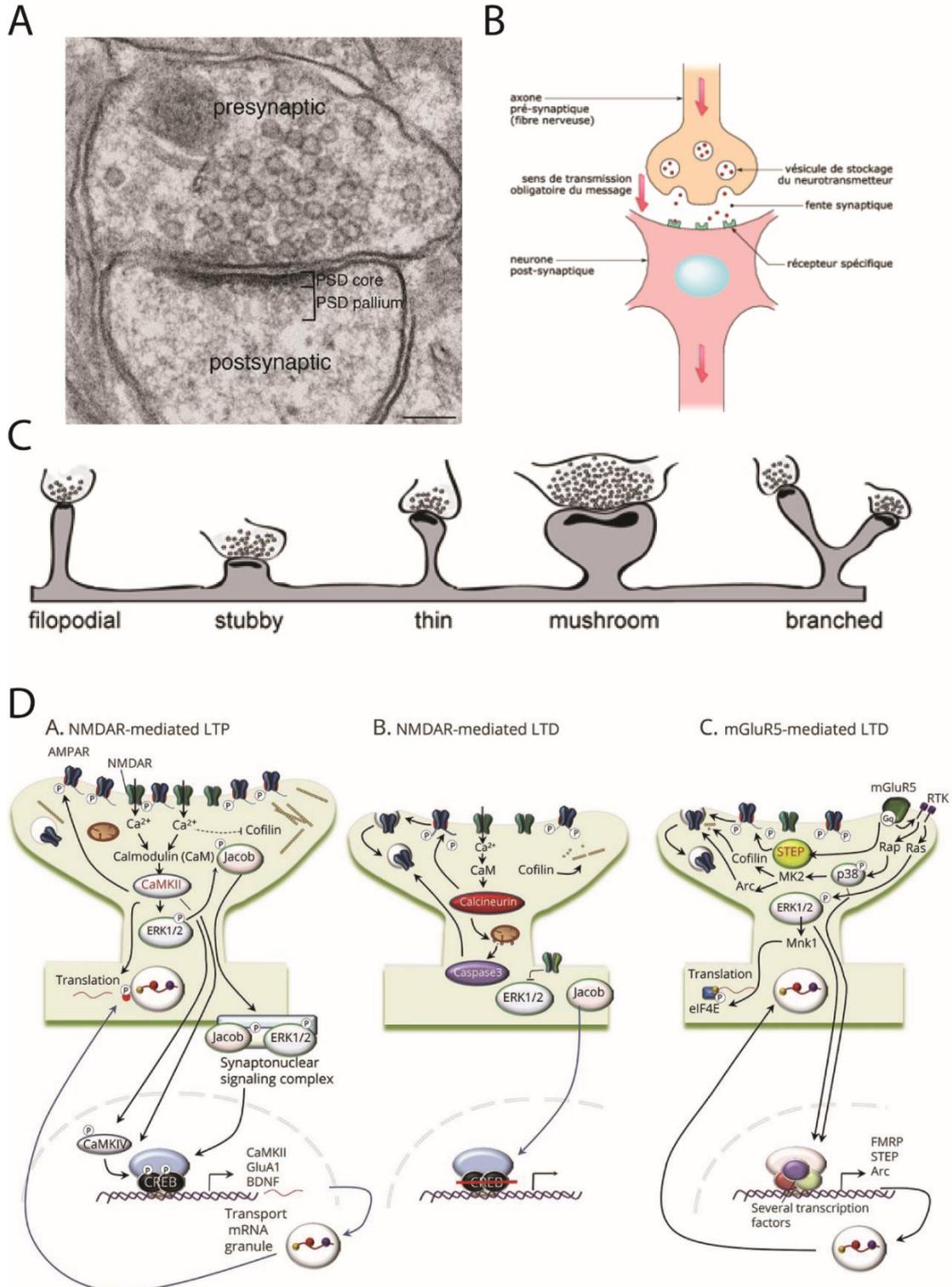
## INTRODUCTION

transporteurs tels que les EAAT2 qui vont permettre la recapture du glutamate et sa réutilisation par la synapse. On trouve aussi au niveau de l'astrocyte des canaux transporteurs du glutamate permettant la recapture du glutamate et son recyclage pour produire de la glutamine qui sera par la suite transférée aux neurones (pour détail, [voir section II.III. D.2](#)). La seconde, moins fréquente, est issue de la métabolisation du lactate fourni par les astrocytes ([section IV.C.4](#)) et l'implication du cycle de Krebs.

Le glutamate, une fois produit, sera ensuite incorporé dans des vésicules grâce aux symports vGluts (Glutamate/H<sup>+</sup>) qui sont conduits principalement par le gradient électrochimique de protons et qui permettent ainsi l'entrée de glutamate dans la vésicule. Pour maintenir ce gradient électrochimique, on trouve également des pompes à protons avec une activité ATPase sur la membrane vésiculaire (Ueda 2016). Le glutamate vésiculaire sera ensuite libéré dans la fente synaptique à la suite d'une élévation de la concentration de calcium dans le bouton présynaptique due à l'arrivée d'un potentiel d'action. Cette augmentation de calcium entraînera en particulier l'activation de la synaptotagmine qui interagira avec les phospholipides membranaires et les protéines SNARE pour former un complexe qui permettra la formation d'un pore et ainsi l'exocytose du glutamate (Südhof 2012).

Le glutamate est donc libéré au niveau de la fente synaptique. Du côté post-synaptique se trouve l'épine dendritique qui contient des récepteurs spécifiques au glutamate de type ionotropique et métabotropique. Les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques qui ne s'ouvrent que grâce à la présence de leur ligand. Dans le cas du glutamate, on trouve deux types majeurs de récepteurs ionotropiques : le récepteur NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate receptors) et les récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid receptors). Les récepteurs NMDA sont des récepteurs qui permettent l'entrée de calcium au niveau de l'épine dendritique. Cette entrée massive d'ions calcium entraîne une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ce qui provoque l'activation de protéines responsables du recrutement de récepteurs AMPA. Les récepteurs AMPA sont composés de plusieurs sous-unités GluRs numérotées de 1 à 4. L'ouverture de ces récepteurs entraîne une entrée d'ions Na<sup>+</sup> et une sortie d'ions K<sup>+</sup>, dans certains cas une entrée de calcium est

aussi observée. Une modification de la sous-unité GluR2 rend d'ailleurs ce canal ionique imperméable aux ions  $Ca^{2+}$  (Bernardinelli, Muller, et Nikonenko 2014). Les NMDA sont exprimés en plus grand nombre très tôt au niveau de la synapse durant le développement contrairement aux récepteurs AMPA. Certaines synapses n'expriment



## INTRODUCTION

Figure II-5 : Morphologie et diversité de la synapses glutamatergiques.

(A) Image TEM d'une synapse glutamatergique. Le bouton présynaptique contient des vésicules et l'on retrouve au niveau de l'épine dendritique les densités post-synaptiques (PSD). (B) Schémas d'une synapse canonique représentant la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique suite à l'arrivée d'un potentiel d'action et la fixation des neurotransmetteurs sur les récepteurs présents sur la membrane post-synaptique. (C) Schématisation des différents types morphologiques de synapses. Stubby = Sans cou ; Thin = Fine ; Mushroom = Champignon ; Branched = Ramifiée. (D) Schématisation de certaines voies de signalisation permettant la mise en place de LTP et LTD. On retrouve la LTP NMDARs-dépendante, la LTD NMDARs dépendante et la LTD mGluR5 dépendante. (Adaptées de Benarroch, 2018 ; Bosch et al., 2015 ; Dosemeci et al., 2016)

que des récepteurs NMDA à leur état de repos et sont considérées comme des synapses silencieuses. Sous l'induction d'une potentialisation à long terme, ces synapses vont rapidement recruter des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluR2 pour les rendre fonctionnelles.

Au niveau des synapses glutamatergiques, d'autres récepteurs qui permettent la modulation de l'activité synaptique sont également présents. Parmi eux, les récepteurs ionotropiques au kaïnate ont une structure et une fonction analogue aux AMPARs, bien qu'ils soient beaucoup moins exprimés. On les retrouve aussi bien au niveau de l'épine dendritique qu'au niveau du bouton présynaptique. Ces récepteurs sont particulièrement impliqués dans des pathologies comme l'épilepsie (Pour revue Pinheiro and Mulle, 2006).

On peut aussi trouver d'autres récepteurs métabotropiques au glutamate communément appelé mGluRs et séparé en trois types : I, II et III qui correspondent respectivement au mGluRs : 1/5, 2/3 et 4/6/8. Les mGluRs de type I, qui sont essentiellement localisés au niveau post-synaptique, sont couplés à la phospholipase C dont l'activation va entraîner différentes voies de signalisation engendrant, entre autres, une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Les mGluRs de types II et III vont quant à eux inhiber, en partie, les canaux calciques et activeront des canaux potassiques. Les récepteurs de type II sont situés tant au niveau présynaptique que post-synaptique, quant aux différents récepteurs de types III on les retrouve essentiellement du côté présynaptique, sauf dans le cas des mGluR6s qui ne sont d'ailleurs exprimés que dans la rétine (Pour revue Niswender and Conan, 2010).

#### III.A.4. La plasticité de la synapse glutamatergique

Les synapses peuvent être modifiées en fonction de leur activité, on parle alors de plasticité synaptique. Les deux mécanismes principaux sont appelés potentialisation à long terme (LTP, Long Term Potentiation) et dépression à long terme (LTD, Long Term Depression). Ces phénomènes sont observés que la synapse soit excitatrice ou inhibitrice. Au niveau de la synapse glutamatergique, ces phénomènes de plasticité sont classiquement déclenchés par les NMDARs. L'induction de LTP ou LTD se fait par des modifications de la phosphorylation des sous-unités des récepteurs AMPA ce qui va déterminer le nombre de ces récepteurs au niveau de la membrane post-synaptique. L'entrée de  $Ca^{2+}$  induite par l'activation des NMDARs active la calmoduline (CaM) activant à son tour la CaM kinase II qui va phosphoryler la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPARs. En parallèle, cette dernière kinase, en activant diverses voies de signalisation, va initier la traduction de nouvelles protéines synaptiques et la transcription de nouveaux ARNms permettant la synthèse de protéines spécifiques qui permettent le maintien à long terme de ce renforcement. À l'inverse, dans la LTD, la CaM active la calcineurine qui va déphosphoryler la sous-unité GluA1 des AMPARs entraînant l'internalisation des récepteurs. De la même façon, les récepteurs mGluR5s peuvent entraîner l'activation de voies de signalisation responsable de la déphosphorylation des récepteurs AMPA et de leur internalisation induisant ainsi également une LTD (Figure II-5, D) (Pour revue Benarroch, 2018).

Ces mécanismes de renforcements synaptiques sont corrélés à des changements morphologiques. La microscopie électronique a permis l'identification à plusieurs reprises de ces remaniements. En premier lieu, il a été montré l'augmentation du nombre d'épines contactant le même bouton axonal 1 heure après induction de LTP (Toni et al. 1999). Par la suite, le remodelage des densités synaptiques fut démontré en observant un élargissement et une perforation des densités post-synaptiques à la suite de l'induction de LTP (Popov et al. 2004 ; Toni et al. 2001). Plus récemment, la corrélation entre les remodelages morphologiques des PSD et l'augmentation du volume des têtes des épines dendritiques ont été observées à la suite de l'induction chimique de LTPs dépendante des récepteurs NMDA (Borczyk et al. 2019). Ces changements morphologiques correspondent d'ailleurs aux différents types

## INTRODUCTION

morphologiques d'épines dendritiques décrits précédemment. Il se trouve d'ailleurs que ces changements morphologiques sont associés à des caractéristiques fonctionnelles. Les épines dendritiques « champignon » sont morphologiquement stables et montrent des oscillations de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  plus faibles tout en étant plus difficiles à potentialiser en comparaison avec les petites épines comme les « fines » (Pour revue Borczyk et al., 2019).

D'autres récepteurs de types métabotropiques ou ionotropiques sont trouvés dans les neurones glutamatergiques, ces récepteurs réagissent à d'autres ligands que le glutamate et permettent de moduler l'activité synaptique. On citera, par exemple, les récepteurs à l'ATP qui peut être sécrétés tant par l'astrocyte que par les terminaisons axonales ; il s'agit des récepteurs métabotropiques purinergiques de l'isotype 1 (P2Y1) et des canaux ioniques purinergiques (P2X). Les P2YRs ont, pour la plupart (à l'exception des 12/13/14), une voie de signalisation similaire aux mGluRs de type I (Erb et Weisman 2012) tandis que les P2Xs sont des canaux ioniques qui permettent une entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^{+}$  dans la cellule. Ces canaux sont localisés au niveau post-synaptique comme présynaptique. Dans le premier cas, ils sont retrouvés hors de la fente synaptique sur les côtés de l'épine dendritique et sur les dendrites ; ils semblent avoir un rôle de régulation des phénomènes de potentialisation à long terme dépendant des récepteurs NMDA en augmentant le seuil de dépolarisation nécessaire. Dans le second cas, ces récepteurs entraînent une augmentation de la probabilité de libération des neurotransmetteurs par le biais d'une augmentation du calcium intracellulaire (pour review ; Khakh and North, 2012). Comme l'ATP peut également être libérée par les astrocytes, nous allons voir maintenant comment l'astrocyte interagit de façon morphologique et fonctionnelle avec les neurones, en particulier au niveau de la synapse.

### III.B. La synapse tripartite

Les interactions entre l'astrocyte et les synapses ne sont pas seulement physiques et dues à des contraintes tissulaires, cette interaction a indubitablement un rôle fonctionnel qui repose sur une communication bidirectionnelle entre la synapse et les prolongements cytoplasmiques astrocytaires périphériques aux synapses (PAPs) de l'astrocyte. Nous allons voir ci-dessous que ces éléments de communication peuvent

induire une modulation de l'activité synaptique, l'astrocyte est donc partie prenante dans cette communication tripartite (Araque et al. 1999).

### III.B.1. Les interactions morphologiques entre la synapse et l'astrocyte

Les études clés visant à comprendre le rôle et la fonction des astrocytes dans la transmission synaptique sont d'abord centrées sur l'interaction entre les processus astrocytaires fins et les synapses. L'utilisation de coupes sériées en microscopie électronique a permis d'étudier la grande variabilité de l'interaction astrocyte/synapse. Dans l'hippocampe du rat mature (65-75 jours), les auteurs ont montré que l'astrocyte est en contact avec 40-60% de la fente synaptique glutamatergique et que l'astrocyte est directement en contact avec l'épine et/ou le bouton présynaptique de la plupart des synapses. Il existe également des différences dans la façon dont l'astrocyte couvre les différents types d'épines, puisque 60 à 99 % des épines en forme de champignon et seulement 40 à 60 % des épines fines sont recouvertes par des prolongements astrocytaires (Witcher, Kirov, et Harris 2007). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant l'imagerie FIB/SEM dans le cortex somatosensoriel en développement du rat. En utilisant la biocytine pour marquer les astrocytes, une équipe a acquis quatre fragments astrocytaires dans le cortex somatosensoriel de rat juvénile (âgé de 14 jours). Les auteurs ont mesuré qu'environ 60 à 90 % des synapses sont en contact avec l'astrocyte et que 97 à 100 % de ces synapses sont en contact avec les processus astrocytaires, mais presque aucune avec le soma de la cellule (Kikuchi et al. 2020). Une autre étude, par l'imagerie d'un volume dans le stratum radiatum de l'hippocampe, a analysé le volume occupé par les astrocytes (fraction volumique, VF) en créant des sphères concentriques, dont le centre est situé sur les surfaces de l'épine dendritique, et en calculant la VF occupée par l'astrocyte dans cette sphère. Ils ont ainsi démontré que les épines en forme de champignon (n=32) présentent une VF de l'astrocyte dans la sphère de 250 nm plus élevée que les épines fines (n=20) (Patrushev et al., 2013). Dans une autre publication, la même équipe a présenté des résultats similaires avec un nombre plus élevé de synapses (n = 207, champignon = 79 ; mince = 128) (Garilov et al., 2018). Ces interactions dans l'hippocampe permettent le maintien de la morphologie des épines dendritiques et sont stabilisées par l'activation des récepteurs EphA4 suite à la libération d'ephrin-A3 libérée par l'astrocyte (Murai et al. 2003).

## INTRODUCTION

### III.B.2. Le contrôle métabolique :

Comme tout tissu biologique, le système nerveux central a besoin d'énergie pour assurer ses fonctions. Le cerveau consomme environ 20% de l'énergie de l'organisme au repos. La majorité de cette consommation énergétique correspond à l'activité des neurones (81%) (Attwell et al. 2010). Cependant, les neurones sont physiquement isolés des vaisseaux sanguins transportant les molécules énergétiques nécessaires grâce à la BHE. Les astrocytes, par leurs contacts avec les neurones (PAPs) et les vaisseaux sanguins (pieds astrocytaires), permettent de former un « pont » pour assurer l'apport de l'énergie nécessaire aux neurones.

L'astrocyte importe donc le glucose directement de la circulation sanguine. Pour cela le glucose passe par les canaux GLUT1 que l'on retrouve tant au niveau de la membrane plasmique astrocytaire qu'au niveau de la membrane des cellules endothéliales (Morgello et al. 1995). Ce glucose peut être directement utilisé par la cellule ou être stocké sous forme de glycogène ; les astrocytes contiennent d'ailleurs la plus grande partie des stocks de glycogènes du SNC, et ce glycogène pourra être métabolisé en glucose ultérieurement (Brown et Ransom 2007). Plus précisément, à l'intérieur de l'astrocyte, le glucose subit une glycolyse anaérobie qui permet de produire du pyruvate qui sera ensuite transformé en lactate, ce dernier sera alors transporté vers les neurones.

Ce lactate pourra ensuite être réutilisé par les neurones pour fournir du pyruvate à la mitochondrie et permettre ainsi la synthèse d'ATP nécessaire à l'activité neuronale. Au niveau des PAPs, dans le cas de la synapse glutamatergiques (par exemple), l'astrocyte va capturer une partie du glutamate grâce à des transporteurs spécifiques impliquant une entrée d'ions  $\text{Na}^+$  et une sortie de  $\text{K}^+$ . L'astrocyte subit donc un changement de concentration ionique, et par conséquent, doit rétablir cette concentration à l'équilibre. Pour ce faire, l'astrocyte possède des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Ces dernières consomment de l'ATP pour permettre le transfert d'ions. Cette énergie sera donc fournie par glycolyse anaérobie permettant la production de pyruvate (et de lactate par extension). Ce mécanisme décrit pour la première fois en 1994 par Pellerin et Magistretti est nommé ANLS (pour Astrocyte Neuron Lactate Shuttle) (Pellerin et Magistretti 1994). On parle aussi maintenant de couplage neuro-métabolique pour

illustrer le couplage entre l'activité neuronale, l'activité de transport et de production d'ATP ainsi que de lactate de l'astrocyte (Magistretti et al. 1999). Il a d'ailleurs été observé que le transport de lactate des astrocytes vers les neurones et la glycolyse est nécessaire à la formation de la mémoire à long terme (Suzuki et al. 2011).

### III.B.3. L'homéostasie ionique - Balance extra synaptique des ions

Nous avons évoqué rapidement le rôle des astrocytes dans la recapture des ions  $K^+$  à la suite de l'activité neuronale. Il se trouve que des études menées sur le nerf optique de mammifères ont montré qu'un seul potentiel d'action peut induire une augmentation de la concentration en ion  $K^+$  extracellulaire 0.5 à 1 mM et qu'une stimulation continue cutanée peut provoquer une augmentation de 3 mM. De la même façon, cette concentration peut atteindre jusqu'à 10 à 20 mM dans des cas de crises convulsives (Hertz et Chen 2016). Dans ces conditions, il semble important que le tissu possède un moyen efficace de rétablir l'équilibre ionique de l'espace extracellulaire. Il semblerait que ces ions soient rapidement absorbés par les astrocytes environnants. Cette « clairance » du potassium est à deux vitesses et peut être soit passive et due à un phénomène de tamponnage spatial soit active en impliquant des pompes de types  $Na^+/K^+$  ATPase ou encore Kir4.1. Dans tous les cas, le potassium est récupéré par l'astrocyte et semble par la suite être redistribué dans le réseau astrocytaire par l'intermédiaire des jonctions communicantes. Ce phénomène semble aussi moduler l'excitabilité neuronale et l'activité synaptique (pour revue Bellot-Saez et al., 2017). Il se trouve que l'astrocyte exerce aussi le même rôle pour d'autres ions nécessaires à l'activité neuronale comme le  $Na^+$  et le  $Ca^{2+}$ .

### III.B.4. La gliotransmission

Il est connu depuis plusieurs décennies que les astrocytes peuvent synthétiser et sécréter des ligands qui ont une affinité pour les récepteurs présents sur les neurones, en particulier au niveau de la synapse. Ces molécules sont nommées « gliotransmetteurs », il s'agit en particulier du glutamate, de la taurine, du neuropeptide Y, de l'ATP, du GABA ou encore de la D-sérine (Martin 1992). La description de la synthèse et de la libération de ces molécules a d'abord été faite sur des astrocytes en cultures, ainsi la possibilité d'observer ce phénomène *in vivo* a été contestée pendant un long moment. De plus, des manipulations pharmacologiques comme génétiques

## INTRODUCTION

réalisées dans le but de reproduire les conditions permettant la libération de gliotransmetteurs par l'astrocyte n'ont pas permis de reproduire de façon fiable ce phénomène (Fiacco et McCarthy 2018).

Ici, nous nous intéresserons essentiellement au glutamate et à la D-sérine. La D-sérine est un co-agoniste du glutamate permettant l'activité NMDAR (Wolosker et Balu 2020). Précédemment ([section II.III.A.4](#)), nous avons vu que la potentialisation à long terme passe par l'activation des récepteurs NMDA. Il a été observé sur des tranches de cerveau de rat que dans l'hippocampe l'induction d'une potentialisation à long terme dépendante des récepteurs NMDA nécessite la sécrétion de D-serine produit par un astrocyte proche des synapses étudiées (Henneberger et al. 2010). Si les astrocytes sont capables de libérer du glutamate et de la d-serine, alors ils sont impliqués dans la potentialisation à long terme de la synapse glutamatergique.

De plus, des études sur des tranches de cerveaux *ex vivo* ont permis de corréler la libération de purine par l'astrocyte à la régulation de l'activité basale synaptique (Panatier et al. 2011a). Il a aussi été montré que la libération de glutamate par les astrocytes contrôle la force synaptique (Jourdain et al. 2007) ; d'ailleurs, l'activation des astrocytes par des techniques d'optogénétique et de chimiogénétique permet une potentialisation *de novo* de synapses sans stimuler l'activité neuronale. Cette potentialisation était responsable d'un renforcement de la mémoire dépendante de l'hippocampe (Adamsky et al., 2018). Il existe donc bien une gliotransmission permettant de moduler l'activité synaptique. La compréhension détaillée des mécanismes endogènes demande encore du travail.

Bien que les travaux s'accumulent suggérant l'existence de cette gliotransmission, les mécanismes qui la régulent sont peu connus. La libération du glutamate ou de la d-serine par les astrocytes pourrait être dépendante de transporteurs particuliers tels que les hémicanaux ou la bestrophin 1 qui est un canal anionique, mais aussi une machinerie vésiculaire semblable à celle des neurones (pour revue Harada et al., 2016). La question n'est pas encore tranchée, mais de nombreuses études soulignent l'importance de la signalisation calcique astrocytaire dans ce mécanisme.

### III.B.5. La recapture et recyclage des neurotransmetteurs

Dans la transmission synaptique glutamatergique, il est estimé que 80% du glutamate libéré dans la fente synaptique est recyclé par les astrocytes. En effet, les astrocytes expriment au niveau de leur membrane des transporteurs à haute affinité pour le glutamate EAAT1 et 2 (pour excitatory amino acid transporter en Anglais), qui portent aussi le nom de GLAST et GLT-1 chez le rongeur. Ces transporteurs sont essentiellement localisés sur la membrane de l'astrocyte qui est proche de la synapse (Chaudhry et al. 1995). La recapture du glutamate par les transporter GLAST et GLT-1 est concomitante d'une entrée d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}^+$  et d'une sortie d'ions  $\text{K}^+$  (Kolenicova et al. 2020). Il est donc important de noter ici qu'une activité neuronale intense va entraîner une entrée massive d'ions  $\text{Na}^+$  dans les astrocytes. En enrobant la synapse et en retirant rapidement le glutamate de la fente synaptique, les astrocytes permettent la préservation de la spécificité et de la qualité de la communication synaptique (Piet et al. 2004 ; Theodosis, Poulain, et Oliet 2008).

Le glutamate, en entrant dans l'astrocyte par les canaux, provoque une augmentation de la concentration en sodium dans la cellule. L'astrocyte se trouve donc devant deux tâches à accomplir : d'un côté il doit recycler le glutamate en glutamine et de l'autre il doit rétablir ses concentrations ioniques à l'état de repos. La régulation de l'afflux d'ion  $\text{Na}^+$  est médiée par des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-ase et le recyclage du glutamate en glutamine est assuré par la glutamine-synthase dans l'astrocyte. Ces processus entraînent une consommation en énergie sous la forme d'ATP (Norenberg et Martinez-Hernandez 1979) ; pour répondre à ce besoin en énergie, l'astrocyte va donc métaboliser une partie du glutamate recapté. On considère que 15% du glutamate est métabolisé tandis 85 % seront recyclés en glutamine (Rothman et al. 2011). La glutamine sera ensuite transférée vers le bouton présynaptique où elle pourra être réutilisée pour synthétiser du glutamate via l'action de la glutaminase ce qui permettra de remplir à nouveau les vésicules synaptiques.

### III.B.6. La plasticité synaptique et remaniement morphologiques astrocytaires

Les astrocytes interagissent avec les synapses par l'intermédiaire des PAPs et fournissent aux neurones l'énergie nécessaire à leurs fonctions. Il se trouve que cette

## INTRODUCTION

interaction entre astrocyte et synapses est également nécessaire au bon développement de la synapse, de sa maturation et de son élimination.

En 1997, une étude menée sur des cultures primaires a permis de mettre en corrélation la présence des astrocytes dans la culture et l'augmentation du nombre synapses ; d'autre part, il a été montré que les synapses des neurones cultivés sans astrocyte sont moins fonctionnelles (Pfrieger et Barres 1997). Par la suite, des facteurs sécrétés par l'astrocyte, tels que la thrombospondine (TSP), ont été identifiés. Ils agissent comme stimulant sur la formation de synapses aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, cependant les synapses formées en culture en présence de TSP seules semblent être silencieuses ; elles ont d'ailleurs peu de récepteurs AMPA (Christopherson et al. 2005). Il semblerait donc que d'autres facteurs sécrétés potentiellement par l'astrocyte soient nécessaires pour la maturation et l'activation synaptiques.

Les astrocytes sécrètent des facteurs de la famille des glycoprotéines (Gpc) et des Chordin qui sont des protéines responsables d'étapes importantes dans le développement et la morphogénèse. Quand sécrétés par les astrocytes, ceux-ci induisent le recrutement au niveau post-synaptique de récepteurs AMPA composés respectivement de la sous-unité GluA1 lors du développement et de la sous-unité GluA2 plus tardivement. Cette phase plus tardive va permettre la mise en place de synapses fonctionnelles matures (Blanco-Suarez et al. 2018).

Tout au long de la vie, les astrocytes sont en contact avec les synapses, mais il faut retenir que cette interaction est elle aussi plastique. Par exemple, des études réalisées à l'aide de la microscopie biphotonique ont permis de montrer que les fins prolongements cytoplasmiques astrocytaires contactent la synapse avant même sa potentialisation (Bernardinelli, Muller, et Nikonenko 2014). L'astrocyte, dans le cas de ces interactions fonctionnelles, subit des remaniements. En observant les interactions entre l'astrocyte et les épines dendritiques au cours du temps, les auteurs ont montré que les processus astrocytaires vont contacter une synapse suite à sa formation, mais le contact ne sera pas toujours maintenu au cours du temps. La durée de cette interaction est corrélée avec la probabilité de maintien de la synapse dans le temps, les synapses contactées pendant une durée croissante par l'astrocyte vont avoir une durée de vie plus grande et la probabilité de leurs disparitions sera plus faible.

La durée de vie de ces synapses est dépendante de l'activation des récepteurs EphA4 localisés au niveau des épines dendritiques, et que nous avons vus comme stabilisant les interactions entre l'astrocyte et l'épine dendritique ([section II.B.1](#)). L'inhibition ou l'activation pharmacologique de ces récepteurs (indépendante du contact astrocytaire) diminue la durée de vie des synapses contactées par l'astrocyte tout en ne modifiant pas la durée de vie des synapses n'étant pas déjà en contact avec l'astrocyte (Nishida et Okabe 2007). Les astrocytes participent donc à la genèse et à la maturation des synapses, mais ils participent aussi à leur élimination. Dans le SNC, les synapses superflues ont besoin d'être supprimées. Les astrocytes participent à cette élimination par leur capacité à les phagocyter grâce à leur récepteur MERTK et MEGF10 (Chung et al. 2013).

### IV. D'autres rôles de l'astrocyte dans le SNC

#### IV.A. L'Astrocyte dans la modulation du transport de l'eau au niveau cérébral

Dans le SNC, les éléments essentiels de la signalisation cellulaire reposent sur des gradients électrochimiques sous la forme de courants d'ions couplés au transport de l'eau. De plus, la production d'énergie qui repose entre autres sur la glycolyse produit de l'eau (6H<sub>2</sub>O sont produites pour 1 glucose consommé), le tissu cérébral doit donc être en mesure de drainer l'excédent d'eau à l'extérieur du neuropile et les astrocytes jouent un rôle essentiel dans la régulation de ces flux.

Les astrocytes expriment des aquaporines (AQP) qui sont des canaux permettant le transport de l'eau de façon plus efficace que par simple diffusion à travers la membrane plasmique. Les AQP sont exprimés dans l'ensemble du tissu nerveux, les astrocytes expriment l'isoforme AQP4 au niveau de leurs prolongements périvasculaires (Nagelhus et Ottersen 2013). Ces aquaporines assurent donc les échanges d'eau entre les compartiments liquides des cellules et l'espace extracellulaire. Il est aussi intéressant de noter qu'à proximité des synapses, des AQP4 de l'astrocyte sont localisées à côté de canaux potassiques Kir4.1, on peut donc envisager que cette proximité permette le couplage entre les modifications de l'osmolarité dues à la libération des ions K<sup>+</sup> et le contrôle du flux aqueux à travers la membrane de l'astrocyte (Amiry-Moghaddam et Ottersen 2003). Plus précisément, une étude suggéra que ce changement d'osmolarité peut entraîner une entrée massive d'eau dans les astrocytes

## INTRODUCTION

et donc un gonflement des prolongements astrocytaires. Ce phénomène pouvant provoquer une réduction de l'espace extracellulaire dans le neuropile en réponse à l'activité neuronale (Haj-Yasein et al. 2012). Cependant, plus d'études sont nécessaires pour préciser la spécificité fonctionnelle de ce phénomène.

### IV.B. Le contrôle du Flux sanguin

Les astrocytes jouent un rôle essentiel au niveau de la barrière hématoencéphalique. On a vu que certains prolongements astrocytaires viennent contacter les vaisseaux sanguins pour former ce que l'on a communément appelé des pieds astrocytaires qui interagissent avec les cellules endothéliales. Au niveau des pieds astrocytaires, on trouve des protéines, telles que le transporteur au glucose, la glycoprotéine P et des canaux tels que Kir4.1 et AQP4 (Abbott, Rönnbäck, et Hansson 2006; Nag 2011). Les astrocytes permettent donc de moduler les échanges au niveau de la barrière hématoencéphalique et particulièrement en interagissant avec les cellules musculaires lisses pour permettre la régulation du flux sanguin (X. Li et al. 2021).

Plus tôt dans le développement de l'individu, l'astrocyte va permettre la maturation du système vasculaire au niveau central. En effet, les astrocytes sécrètent des facteurs de croissance tels que VEGF, GDNF, bFGF et l'ANG-1 (Abbott, Rönnbäck, et Hansson 2006; Alvarez, Katayama, et Prat 2013) qui vont permettre la formation de jonctions serrées, ainsi que la synthèse et la promotion de systèmes enzymatiques et de certains transporteurs au sein des cellules endothéliales (Wong et al. 2013). Les astrocytes sont aussi nécessaires à la réparation des vaisseaux sanguins après une rupture d'anévrisme (Williamson et al. 2021).

### IV.C. Les astrocytes dans l'inflammation du SNC :

Les astrocytes sont sensibles à des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF-alpha, les interleukines 1 bêta ou 17 (Qian et al. 2007, 1) et l'activation des récepteurs Toll Like (L. Li et al. 2021). Ces cellules réagissent aux facteurs pro-inflammatoires en activant la voie de signalisation NFkB qui va, à son tour, entraîner la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. Cette réactivité des astrocytes est maintenant bien établie et il est désormais accepté que l'astrocyte va interagir avec de nombreux éléments du système nerveux central lors d'inflammation. Il y a par exemple une communication bidirectionnelle avec les microglies. Ces cellules, comme les astrocytes, vont sécréter

des facteurs pro-inflammatoires comme anti-inflammatoires en cas d'inflammation. Ces facteurs permettent l'échange d'informations entre les deux types cellulaires et donc permettent la régulation fine de leur activité. De même, l'astrocyte va communiquer avec les oligodendrocytes et peuvent provoquer l'apoptose de ces cellules, mais aussi recruter des progéniteurs dans les sites d'inflammation, et même réguler la remyélination des neurones. Les astrocytes permettent aussi l'entrée de cellules immunitaires dans le tissu nerveux de par leurs interactions avec les cellules endothéliales (Figure II-6) (pour revue Linnerbauer et al., 2020).

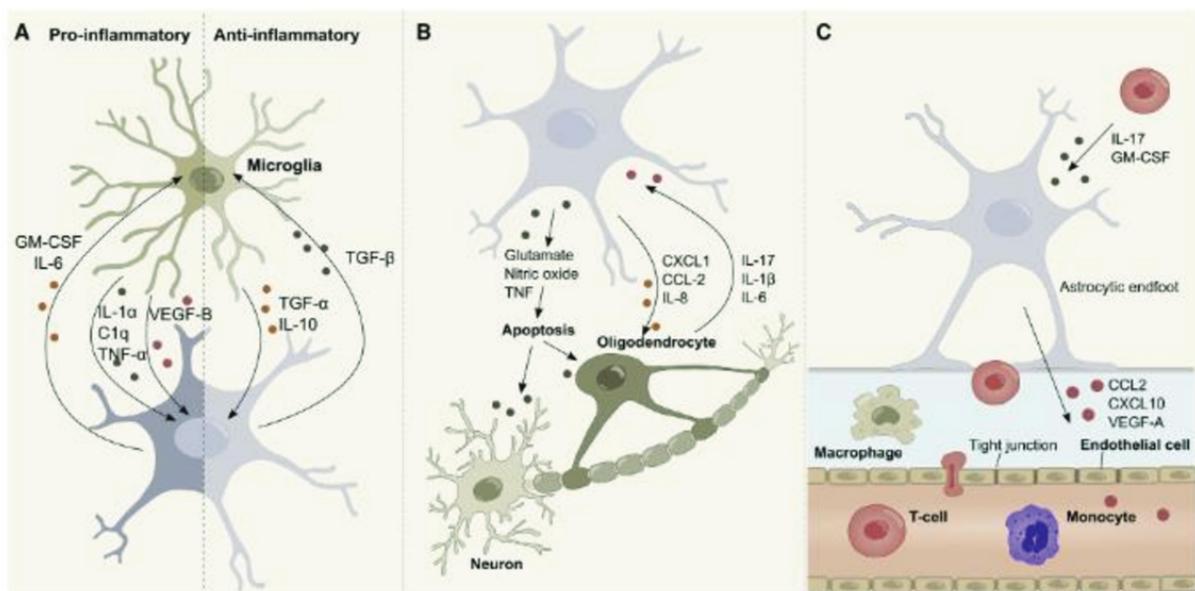


Figure II-6 : Communication entre l'astrocyte et les types cellulaires du SNC.

(A) Communication bidirectionnelle entre les astrocytes et la microglie en cas d'inflammation. (B) En réponse aux facteurs pro-inflammatoires, les astrocytes libèrent des facteurs neurotoxiques entraînant l'apoptose des neurones et des oligodendrocytes. Cependant, les astrocytes favorisent aussi le recrutement des oligodendrocytes par la sécrétion de cytokines, et les oligodendrocytes sont en capacité d'activer les astrocytes par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. (C) Les astrocytes sont activés par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les leucocytes. Les astrocytes permettent l'entrée de leucocytes à travers l'épithélium vasculaire en modifiant sa perméabilité par la sécrétion de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance tels que le VEGF-A (Adaptée de Linnerbauer et al., 2020).

## V. Conclusion intermédiaire

L'astrocyte est donc un réel chef d'orchestre au sein du système nerveux central. Nous allons voir maintenant que sa partition est très complexe. En effet, les mécanismes permettant la régulation des nombreux rôles physiologiques de l'astrocyte doivent être

## INTRODUCTION

finement régulés. Contrairement aux neurones, ces cellules ne sont pas excitables d'un point de vue électrique, mais nous avons déjà brièvement évoqué l'importance de la signalisation calcique dans ces cellules. Nous allons voir dans le chapitre suivant comment la signalisation calcique astrocytaire est formée et régulée, et en quoi elle est étroitement liée avec leur communication avec les synapses. Pour cela, nous verrons aussi l'importance des études structurales dans la compréhension de cette signalisation et de cette communication.

## Chapitre III: La signalisation calcique au sein de l'astrocyte

Nous avons vu dans la section précédente que les astrocytes sont des cellules polyvalentes qui contribuent à de nombreux mécanismes physiologiques permettant le maintien de l'homéostasie au niveau du SNC. Toutes ces fonctions doivent être coordonnées à l'activité des neurones et des autres cellules du SNC, des mécanismes fins et sophistiqués doivent donc réguler ces activités. Nous allons voir dans cette partie que la signalisation est centrale dans la communication intracellulaire chez les eucaryotes et que le développement de sonde spécifique a permis cette étude de manière très fine. Enfin, nous détaillerons la signalisation calcique dans les astrocytes et en particulier le rôle des compartiments intracellulaires dans cette signalisation.

### I. L'ion $\text{Ca}^{2+}$ un messenger ubiquitaire

Le calcium a un rôle prépondérant dans la transmission du signal au sein des cellules eucaryotes. Il est impliqué dans le déclenchement de l'apoptose, la différenciation, la croissance cellulaire, mais aussi dans la transcription des gènes, la contraction musculaire, l'immunité et bien d'autres mécanismes. Ce faisant, le calcium est considéré comme un messenger intracellulaire ubiquitaire chez les eucaryotes (pour revue; Berridge et al., 2003). Typiquement la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) est de l'ordre de 100 nM dans les cellules non excitables dans le règne eucaryote (Doherty, Ghalambor, et Donahue 2015).

Lorsqu'on parle de signalisation, on entend par là la variation de la concentration en ion  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme. Les différences de variations constituent donc la base de l'encodage de cette signalisation. Ces variations peuvent être mesurées en termes d'amplitude, de fréquence, de durée et de propagation de ces événements au sein de la cellule. Ces variations reposent sur deux éléments majeurs : la présence de réserve interne de calcium dans la cellule ainsi que la présence de pompes et de canaux transmembranaires perméables au calcium. Les canaux transmembranaires vont faciliter des flux de calcium dans le sens du gradient électrochimique transmembranaire et les pompes, quant à elles, vont permettre le transport de calcium contre ce gradient. Les pompes pourront également permettre le rétablissement d'un

## INTRODUCTION

niveau basal de calcium intracellulaire ainsi que le transport de calcium à l'encontre du gradient en réponse à un stimulus intra ou extracellulaire particulier. Les stocks internes de calciums pourront quant à eux libérer du calcium à la suite d'un stimulus ou se remplir au besoin. L'action couplée de ces trois mécanismes permet ce que l'on définit comme la signalisation calcique. Le stock de calcium le plus connu est le réticulum endoplasmique, mais la mitochondrie peut aussi exercer ce rôle (Contreras et al. 2010). Pour une revue détaillée de la signalisation calcique et des molécules impliquées, voir (Michael J. Berridge, Bootman, et Roderick 2003; Dupont et al. 2016).

Nous verrons en détail l'origine de la signalisation calcique astrocytaire dans la [section II.III](#), mais tout d'abord nous allons décrire les techniques permettant l'étude de la signalisation calcique en biologie cellulaire.

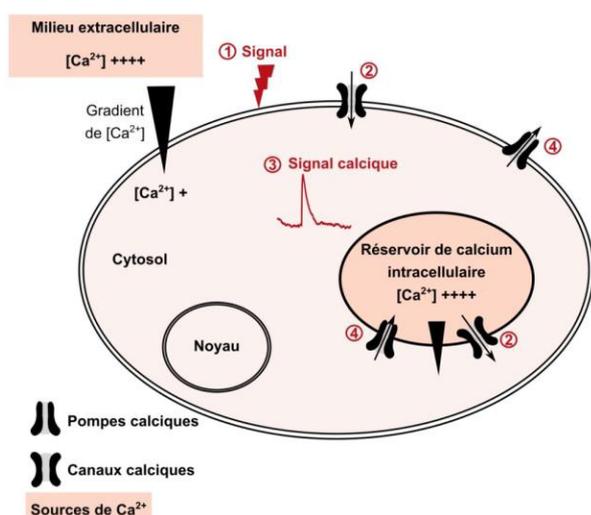


Figure III-1 : La signalisation calcique dans les cellules eucaryotes.

Un signal calcique correspond à une augmentation de la concentration en calcium ( $[Ca^{2+}]$ ) dans les compartiments intracellulaires (cytosol et organites). La concentration en calcium dans les stocks intracellulaire et au niveau extracellulaire est 100 fois supérieure à celle du cytosol. En réponse à un signal (1) les canaux calciques s'ouvrent (2). Le calcium est transféré des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées, engendrant de fait une augmentation de la concentration en calcium (3). La concentration dans les différents compartiments est ensuite rétablie par l'activité de pompes calciques (4). (Adaptée de Denizot 2019)

## II. Méthodes expérimentales pour étudier la signalisation calcique :

### II.A. Imagerie calcique :

L'imagerie calcique repose sur la microscopie optique à fluorescence. Dans les années 1990, le développement de sondes calciques fluorescentes a d'abord permis l'étude de cette signalisation sur des cellules en culture, puis, avec l'utilisation du microscope à deux photons, il a été possible d'imager les signaux calciques aussi bien ex vivo qu'in vivo. La base de la technique repose donc sur l'utilisation de sondes calciques fluorescentes. De manière simplifiée, ces sondes ont une grande affinité pour les ions calciums, la fixation de  $Ca^{2+}$  à la sonde engendre un changement de conformation de la molécule qui provoque une augmentation de la fluorescence.

#### II.A.1. Les colorants organiques :

Actuellement, il existe différentes sondes fluorescentes qui n'ont pas la même affinité et la même cinétique. Les premières molécules utilisées étaient des colorants organiques telles que le Fluo4, OGB et Orgon Green BAPTA. Ces colorants ont été essentiels à l'avènement de l'étude de la signalisation calcique astrocytaire. Ils ont permis les premières identifications de couplage entre signalisation calcique astrocytaire et activité neuronale ex vivo (Castro et al. 2011 ; Panatier et al. 2011; Rusakov 2015; Volterra, Liaudet, et Savtchouk 2014) et ils ont été utilisés pour les premiers enregistrements in vivo (Hirase et al. 2004). Cependant, ces colorants organiques présentent de nombreux désavantages. La nécessité de « patcher » les cellules pour injecter directement le colorant dans le cytosol peut provoquer des perturbations de la physiologie cellulaire, la mort cellulaire et dans le cas de l'astrocyte ne permettre que le marquage des prolongements les plus larges et du corps cellulaire (Tong et al. 2013). Bien que ces colorants existent aussi sous forme perméable à la membrane plasmique et donc évitent la nécessité du patch, ils perdent alors leur spécificité cellulaire. De plus, ils ne permettent que la réalisation d'expérience d'imagerie sur le temps court.

#### II.A.2. Les biocapteurs :

Pour contrecarrer les défauts des colorants organiques, il a été développé différentes stratégies. L'une d'elles consiste à traquer des molécules qui appartiennent à la chaîne de signalisation comme les GPCR (Conway et Demarest 2002), IP3 (Tanimura et al.

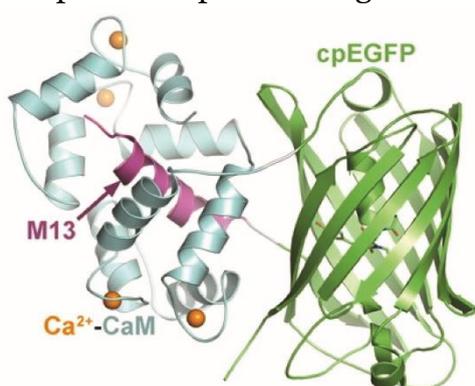
## INTRODUCTION

2013), PKA (Barbagallo et al. 2016) et AMPc (Surdo et al. 2017). Cependant, cela ne permet que d'indiquer de façon indirecte la présence et l'importance de la signalisation calcique au sein du tissu ou de la cellule.

### II.A.3. Les indicateurs calciques génétiquement encodés :

La meilleure option, et la plus utilisée à l'heure actuelle, est les indicateurs calciques génétiquement encodés. Les GCaMPs font partie de cette famille d'indicateurs. Ce sont des constructions moléculaires alliant une GFP (green fluorescent protein), une myosine et une calmoduline. Lorsque le calcium se fixe à la calmoduline, cela entraîne une modification de sa conformation et ainsi un mouvement de la myosine tordant l'hélice de la GFP ce qui produit une émission de fluorescence verte. Les GCaMPs et en particulier la GCaMP6s ne provoquent pas beaucoup de bruit de fond, ce qui permet d'obtenir des enregistrements très clairs de leur activité (T.-W. Chen et al. 2013). Les GCaMPs existent avec différentes cinétiques permettant de saisir différents types d'évènements des plus rapides aux plus lents (figure III-2). De plus, la protéine ne tamponne pas les ions calcium au niveau du cytoplasme et n'inhibe, a priori, aucun type d'activité. Depuis leurs apparitions, la technique est en constante évolution et des adaptations sont faites pour les rendre plus sensibles, obtenir différents niveaux de cinétique et donc augmenter leur résolution temporelle et spatiale.

Ces indicateurs encodés génétiquement permettent de résoudre les problèmes liés au patch-clamp utilisé pour l'intégration des colorants cités précédemment et leur



expression étant mieux répartie au sein de la cellule. Ces indicateurs calciques sont exprimés sous un promoteur du type cellulaire étudié

Figure III-2: Cinétique des sondes calciques

Représentation de la composition typique d'une sonde de type GCaMP : protéine fluorescente de type GFP (cpEGFP), myosine (M13) et la Calmoduline (Cam) interagissant avec divers ions  $Ca^{2+}$  (panneau du haut). Tableau des cinétiques de différents indicateurs calciques.

Sonde	$k_{on}(M^{-1}.s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	Source
Fluo4	$6 \cdot 10^8$	210	Tang et al., 2015
GCaMP3	$7.45 \cdot 10^6$	2.57	Chen et al., 2013
GCaMP6f	$4.3 \cdot 10^6$	69	Dana et al., 2018
jGCaMP7f	$9.44 \cdot 10^6$	4.01	Dana et al., 2018

permettant des enregistrements de longue durée. Par exemple, dans le cas de l'étude des astrocytes, ces promoteurs seront ceux de la GFAP, du S100 $\beta$  ou de l'ADHL1 ce qui permet la spécificité de leur expression. Désormais, ces indicateurs calciques sont aussi utilisés pour étudier la dynamique calcique de compartiments intracellulaires cellulaires en les ciblant vers le réticulum (Henderson et al. 2015), la mitochondrie (H. Li et al. 2014) ou la membrane plasmique (Srinivasan et al. 2016) (pour revue ; Shigetomi et al., 2016)

### III. L'origine des signaux calcique au sein de l'astrocyte :

Nous avons vu que la signalisation calcique est ubiquitaire dans le règne eucaryote et que cette signalisation peut être observée très finement grâce au développement de sondes calciques pour la microscopie à fluorescence. L'astrocyte n'étant pas considéré comme une cellule électriquement excitable la prépondérance du calcium dans tous les processus physiologiques astrocytaires et ses variations importantes au sein de la cellule ont suggéré l'idée d'excitabilité calcique.

Le concept d'excitabilité calcique fut introduit par de premières expériences réalisées en utilisant des techniques d'imagerie calcique pour l'étude des astrocytes. Une première étude a montré une augmentation du calcium intracellulaire dans les astrocytes à la suite d'une stimulation par le glutamate d'astrocytes en cultures (Ann H. Cornell-Bell et al. 1990). Dans une étude suivante, les mêmes auteurs ont montré que cette augmentation calcique se propage sous forme de « vagues calciques » à travers le réseau astrocytaire. Ces vagues calciques correspondaient à des augmentations massives du calcium se propageant de cellule en cellule au sein du réseau astrocytaire sur de très longues distances (300–400  $\mu\text{m}$ ) (A. H. Cornell-Bell et Finkbeiner 1991). Elles ont par la suite été observées ex vivo dans la rétine (Newman et Zahs 1997) et le corps calleux (Schipke et al. 2002).

Cependant, la signalisation calcique ne s'arrête pas à ces larges augmentations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires qui se propageant au sein du réseau astrocytaire. La complexité de la signalisation astrocytaire est apparue à la suite de l'évolution des techniques de microscopie, et en particulier, grâce à l'apport de la microscopie biphotonique qui permet une acquisition rapide d'image sur un large volume (W. Göbel, Kampa, et Helmchen 2007). De plus, le développement des GECIs, comme la GCaMP6 qui est

## INTRODUCTION

extrêmement sensible, permet dorénavant d'imager des événements extrêmement fugaces (Chen et al., 2013 ; Shigetomi et al., 2013). En effet, le laboratoire du professeur Andrea Volterra a montré grâce à cet indicateur que 80 % de la signalisation calcique est localisée dans ce qu'ils identifient comme le gliapil ou le domaine spongiforme de l'astrocyte ([voir section II.II.E.](#)). Ces événements sont rapides et extrêmement localisés ce qui leur a donné le nom de microdomaines calciques. Il a été montré que certains de ces événements sont sensibles à tétródotoxine (TTX), ce qui veut dire qu'ils sont liés à l'activité neuronale. Dans la même étude, il a été montré que des événements larges et rapides peuvent apparaître dans les larges prolongements cytoplasmiques émergeant du corps cellulaire et que ces événements peuvent être bidirectionnels (de la périphérie vers le corps cellulaire et inversement). Des événements ayant le même profil sont aussi observés au niveau des pieds astrocytaires (Bindocci et al. 2017).

Pour résumer, les patterns spatiaux de la signalisation calcique astrocytaire sont constitués de : (1) des vagues calciques se propageant le réseau astrocytaire (2) des événements globaux qui se propagent dans tout l'astrocyte (3) d'une vague calcique localisée qui peuvent se propager de façon bidirectionnelle vers ou depuis le corps cellulaire (4) d'une signalisation calcique restreinte au pied astrocytaire et (5) des événements très localisés et rapides (microdomaines) dans les filaments fins de l'astrocyte (gliapil) qui peuvent être sensibles à l'activité neuronale ou spontanée. Pour que ces événements puissent exister, il faut une source de calcium. Nous allons voir que cette source de calcium peut-être est intracellulaire, mettant en jeu des organites tels que le réticulum endoplasmique et la mitochondrie, soit extracellulaire, en impliquant des protéines de la membrane plasmique astrocytaire.

### III.A. Compartiments intracellulaires impliqués dans la signalisation calcique

#### III.A.1. Le réticulum endoplasmique :

Le réticulum endoplasmique (RE) est considéré comme le premier acteur majeur de la signalisation calcique, car il peut libérer son contenu de calcium à la suite de la liaison d'un messenger secondaire (l'IP<sub>3</sub>) sur un récepteur placé sur la membrane du RE. Ce second messenger est produit suite à l'activation de récepteurs couplés à la protéine G et engendre le clivage des phosphatidylinositol-4,5-biphosphates (PIP<sub>2</sub>) présents sur la membrane plasmique par la phospholipase C (PLC) conduisant à la synthèse

d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> peut ensuite diffuser à travers le cytoplasme de la cellule jusqu'à se lier avec les récepteurs Inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>Rs) ce qui engendre la libération de Ca<sup>2+</sup> du lumen du ER vers le cytosol de la cellule.

Les récepteurs IP<sub>3</sub>Rs sont des polypeptides avec 5 domaines majeurs : leur N-terminal, le domaine de liaison de l'IP<sub>3</sub>, le domaine central permettant la modulation de son activité et le C-terminal qui constitue la zone d'ouverture du canal. 5 sous-unités permettent de former un récepteur fonctionnel, ces récepteurs peuvent d'ailleurs exister sous forme d'homo - ou hétérotétramères. Il existe 3 isoformes d'IP<sub>3</sub>Rs qui diffèrent non seulement par leurs domaines de liaisons à l'IP<sub>3</sub>, mais aussi par leur domaine dit de modulation qui permet des interactions avec la calmoduline ainsi que leur phosphorylation. Ces différences influencent donc leur affinité et leur spécificité pour leurs ligands et modulent les propriétés de libération du calcium par ces récepteurs (M. J. Berridge 1993; Bosanac et al. 2002; Mikoshiba 2007; Taylor 2017).

Il est connu de nos jours qu'une augmentation de calcium local peut aussi causer une libération de calcium des stocks intracellulaires. Ce phénomène est souvent décrit par l'anagramme CICR (pour Ca<sup>2+</sup>-induced-Ca<sup>2+</sup>-release en anglais). Il se trouve que les IP<sub>3</sub>Rs peuvent être mis en jeu dans ce phénomène. Cependant il nécessite la présence d'IP<sub>3</sub>, car l'ouverture de ces récepteurs peut se produire seulement suite à la fixation d'IP<sub>3</sub>. Il est plus courant de considérer que ce phénomène de CIRCE est dû à la présence de récepteurs à la ryanodine. Cependant, le rôle de ces récepteurs dans l'activité calcique astrocytaire n'est pas encore bien défini. Les derniers acteurs majeurs de la signalisation calcique médiée par le réticulum endoplasmique sont des pompes permettant le remplissage du RE. Nous les développerons en [section III.A.1. ii](#), mais tout d'abord nous allons voir la signalisation calcique astrocytaire dépendante des récepteurs à l'IP<sub>3</sub>.

#### *III.A.1.i. La signalisation calcique astrocytaire médiée par les récepteurs à IP<sub>3</sub> :*

Parmi les trois isoformes d'IP<sub>3</sub>Rs existants, l'isoforme 2 fut le plus étudié dans la signalisation calcique astrocytaire. L'expression de cet isoforme dans les astrocytes corticaux, mais aussi dans les astrocytes de l'hippocampe, a été démontrée grâce à des expériences d'immunohistochimie (Hertle et Yeckel 2007; Sharp et al. 1999). Ces

## INTRODUCTION

expériences ont d'ailleurs suggéré que cet isoforme est exprimé de façon prédominante dans les astrocytes, et ce constat fut par la suite renforcé par des analyses transcriptomiques. Cependant, cette observation n'est pas toujours la même selon la région étudiée, l'espèce et l'âge des individus : l'isoforme 1 est parfois plus exprimé que l'isoforme 2.

Chez les rats, par exemple, les données actuelles en protéomique tendent à dire que IP3R1 n'est pas exprimé dans de nombreuses régions du cerveau comme dans l'hippocampe de jeunes individus comme des adultes (Holtzclaw et al. 2002). Tandis que chez la souris, des études de transcriptome ont montré que l'isoforme 2 est majoritaire chez les jeunes souris dans l'hippocampe jusqu'à 9 semaines et dans le cortex jusqu'à 10 semaines (Clarke et al. 2018 ; Srinivasan et al. 2016 ; Zhang et al. 2014). Ensuite, on retrouve une surexpression de IP3R1 chez les animaux vieillissants. Cependant, dans le striatum, il semblerait que l'isoforme 1 est majoritaire après 1 semaine (Chai et al. 2017 ; Clarke et al. 2018). L'isoforme IP3R1 fut localisé dans l'astrocyte plus précisément au niveau de structures assimilables à la synapse tripartite, c'est-à-dire au niveau des PAPs grâce à l'utilisation de techniques de pointe permettant d'isoler seulement ces structures (Tetsuya Takano et al. 2020). La présence d'IP3Rs suggère la présence de réticulum endoplasmique dans ces structures. Tandis que, l'isoforme 2 a bien été décrit dans le soma et les larges prolongements cytoplasmiques de l'astrocyte, mais pas dans ces filaments fins (N. Chen et al. 2012 ; Tetsuya Takano et al. 2020).

Depuis maintenant dix ans, de nombreuses études se sont intéressées au rôle d'IP3R2s dans la signalisation calcique de l'astrocyte, qui ont été considérés les principaux IP3Rs des astrocytes. Ces études, reposant souvent sur l'usage de souris knock-out pour IP3R2s (IP3R2-KO), ont montré que les larges vagues calciques au sein des compartiments larges de l'astrocyte comme les corps cellulaires sont abolies dans ce modèle murin (Castro et al. 2011 ; Okubo et al. 2019 ; Petravicz, Fiacco, et McCarthy 2008 ; Takata et al. 2013). Il est cependant intéressant de noter que la suppression de la signalisation calcique astrocytaire semble plus générale à la suite d'un traitement à l'héparine qui est un antagoniste de IP3 ou la glutathione-S-transferase (GST), une molécule tampon à IP3 (Mark William Sherwood et al. 2017 ; Tanaka et al. 2013). De

la même façon, l'utilisation de cyclopiazonic acide (CPA) pour empêcher le remplissage en calcium du réticulum endoplasmique aboli de façon plus large la signalisation calcique astrocytaire que chez les modèles IP3R2<sup>-/-</sup> (Okubo et al. 2019). Ces résultats permettent donc de suggérer un rôle des autres isoformes de récepteurs à l'IP3R présents dans l'astrocyte.

Bien que l'IP3R3 soit peu exprimé dans les astrocytes en général et dans les astrocytes de l'hippocampe en particulier, cet isoforme fut étudié pour son rôle dans la signalisation calcique astrocytaire IP3R2 indépendante. Pour se faire, les auteurs ont comparé l'activité calcique des astrocytes observée grâce au GECI GcAMP3 dans l'hippocampe de souris avec un phénotype sauvage (WT ; Wild Type) ; IP3R2<sup>-/-</sup> ; IP3R3<sup>-/-</sup> ; IP3R2&3<sup>-/-</sup>. En comparant les deux premiers, les auteurs ont confirmé une diminution de la fréquence, de l'amplitude et de l'étendue des événements dans les prolongements cytoplasmiques de l'astrocyte, mais ces événements sont cependant plus longs. La comparaison des caractéristiques des oscillations calciques entre IP3R2<sup>-/-</sup> et du double knock-out IP3R2&3 révéla essentiellement une diminution de l'étendue et de la durée des événements dans les prolongements cytoplasmiques. Tandis qu'une diminution de l'amplitude des événements fut observée au niveau du corps cellulaire (Mark William Sherwood et al. 2017). Ces résultats corroborent donc le rôle d'IP3R3 dans la signalisation calcique astrocytaire, mais le double knock-out ne semble pas inhiber autant la signalisation calcique observée que l'héparine ou la GST, ce qui renforce la possibilité d'une contribution de l'isoforme IP3R1 dans l'astrocyte. Malheureusement, pour le moment, le rôle de ce récepteur dans l'activité calcique astrocytaire est encore peu étudié.

*III.A.1.ii. SOCE et SERCA, des acteurs essentiels à la signalisation calcique astrocytaire médiée par le réticulum endoplasmique :*

La capacité du réticulum endoplasmique à libérer du calcium dépend de sa capacité à remplir ces stocks. Pour cela, le système SOCE (pour store operated calcium entry en anglais) permet le remplissage du réticulum endoplasmique de façon indirecte. En effet, ce système, lorsque le RE est vide, va permettre l'ouverture de canaux calciques spécifiques au niveau des contacts entre le RE et la membrane plasmique. Cette ouverture va provoquer une entrée massive de calcium dans la cellule mettant à

## INTRODUCTION

disposition du RE une plus grande quantité de calcium (Prakriya et Lewis 2015). Parmi les acteurs de ce mécanisme dans l'astrocyte, on retrouve STIM1/2 et Orai 1/2/3, des protéines situées respectivement sur la membrane du RE et sur la membrane plasmique de l'astrocyte au niveau des contacts RE-PM (Golovina 2005).

Les SOCEs peuvent être d'ailleurs la source de formation de microdomaines. En effet, la libération d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  permise par l'ouverture des IP<sub>3</sub>Rs provoque une augmentation transitoire de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  et l'ouverture des canaux SOCEs. L'ouverture des SOCES entraîne une augmentation longue de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule au niveau de la jonction RE-PM. Ces oscillations calciques spécifiques peuvent être associées à des microdomaines observés dans les PAPs (Lia et al. 2021).

D'autres pompes spécifiques servent à transférer le calcium du cytosol vers le lumen. Ces pompes sont par exemple les SERCAs (pour smooth endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase en anglais) qui sont présentes sur la membrane du RE, et peuvent, suite à l'hydrolyse de l'ATP, créer une entrée de calcium du cytosol vers le lumen du réticulum endoplasmique. Ces pompes permettent donc aussi de maintenir un gradient de concentration ionique entre le cytosol et le lumen du réticulum endoplasmique (Verkhatsky et Nedergaard 2018).

### III.A.2. La mitochondrie

Depuis les années soixante, la mitochondrie est connue pour être capable d'accumuler activement du calcium grâce aux mCU (mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter en anglais) qui sont des protéines transmembranaires de la membrane interne de la mitochondrie. Le transport des ions calcium à travers ces canaux est dépendant du potentiel de membrane ainsi que du gradient de concentration entre le cytosol et la matrice mitochondriale (Marchi et Pinton 2014). Ces canaux ont une faible affinité au calcium donc la concentration en calcium du cytosol doit être d'au moins 5-10  $\mu\text{M}$ . Par la suite, la présence d'antiport ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  - NCLX) permettant la libération de calcium de la mitochondrie vers le milieu intracellulaire fut démontrée dans les années soixante-dix (Palty, Hershinkel, et Sekler 2012). Plus récemment, en 1996, les mPTP (pour mitochondriale transition pore), qui sont de larges pores très peu sélectifs, ont été suggérés comme ayant un vrai potentiel dans la libération de calcium par la

mitochondrie (Bernardi et von Stockum 2012). La mitochondrie dans les cellules eucaryotes peut donc être considérée tant comme une source qu'un puits de calcium.

Dans ce contexte, certains travaux ont étudié le rôle de la mitochondrie dans la signalisation calcique astrocytaire. Il a tout d'abord été observé dans des astrocytes en culture que la disparition du potentiel de membrane mitochondrial causée par un traitement au carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenyl-hydraxone (FCCP, découpleur de protons) induit une diminution de la rapidité de disparition des événements calciques en augmentant leur distance de propagation (Boitier, Rea, et Duchon 1999; Jackson et Robinson 2015). Parallèlement, la perte de mitochondrie à la suite d'une déprivation en oxygène et en glucose induit dans les astrocytes une forte augmentation de la signalisation calcique (O'Donnell, Jackson, et Robinson 2016). Ces résultats confirment la capacité des mitochondries de l'astrocyte à puiser le calcium intracellulaire et à modifier la signalisation calcique dans ce type cellulaire (Jackson et Robinson 2018; 2015).

Dans les astrocytes en culture, il a été observé la présence de domaines calciques qui sont colocalisés avec les mitochondries (Jackson et Robinson 2015; O'Donnell, Jackson, et Robinson 2016). Ce phénomène fut aussi observé in situ sur des microdomaines ayant une activité spontanée ou médiée par certains neurotransmetteurs comme la noradrénaline. De plus, la fréquence et l'amplitude des événements dans les microdomaines « spontanés » suite à l'inhibition des canaux mPTP par la cyclosporine A et la roténone diminuent ; à l'inverse l'induction de l'ouverture de ces canaux grâce à l'utilisation de la carboxyatractyloside (CAtr) provoque une augmentation : du nombre de domaines, de la fréquence d'événement sans en modifier l'amplitude (Agarwal et al. 2017). Cette étude a aussi mis en évidence l'indépendance aux récepteurs IP<sub>3</sub>R2 de la signalisation calcique observée, or, nous allons maintenant voir la prédominance du réticulum endoplasmique et des récepteurs à l'IP<sub>3</sub>Rs dans la signalisation calcique astrocytaire.

### III.A.3. Synergie entre réticulum endoplasmique et mitochondrie dans la signalisation calcique astrocytaire :

Dans le domaine de la biologie cellulaire, il est bien connu que la mitochondrie interagit avec d'autres compartiments cellulaires. Ces sites de contact sont appelés membrane

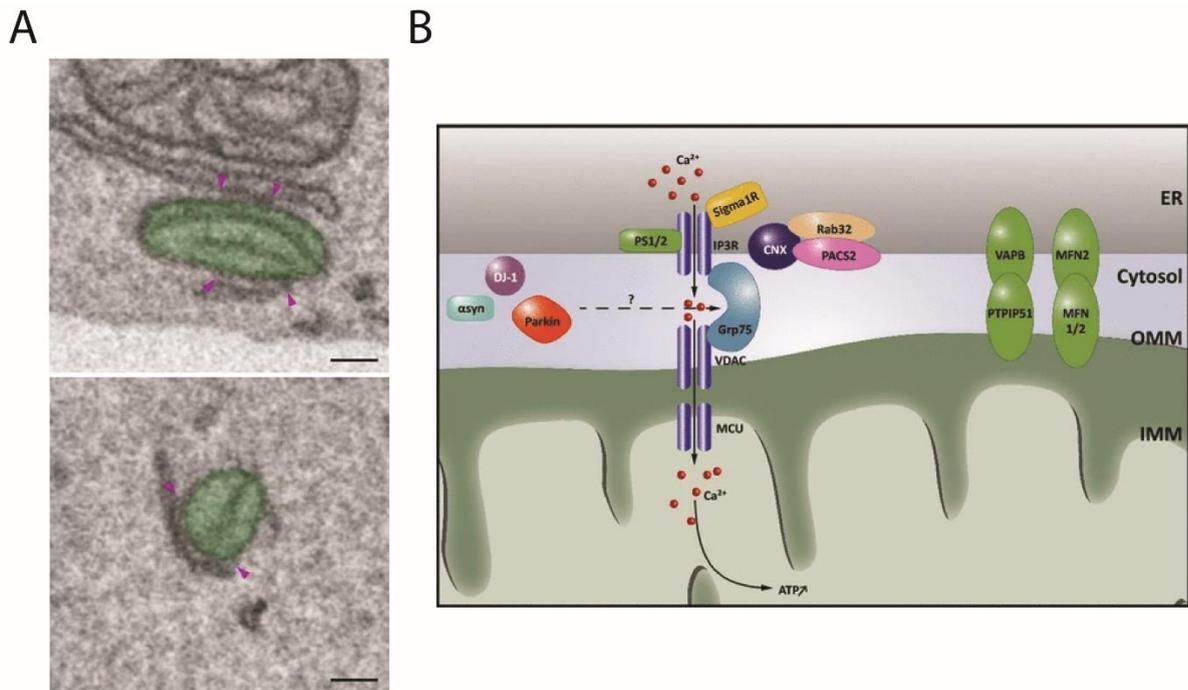
## INTRODUCTION

associée à la mitochondrie (MAM) (Vance 2014). Lorsqu'une telle interaction a lieu entre le réticulum et la mitochondrie, elle est alors communément appelée MERCs (Mitochondrial-ER Contact).

Il est possible que cette organisation facilite l'entrée de calcium dans la mitochondrie en créant une augmentation forte de la concentration locale en calcium au niveau de la membrane mitochondriale. Le transport de calcium dans les MERCs vers l'intérieur de la mitochondrie par les récepteurs à faible affinité mCUs (mitochondrial calcium uniporter) de la membrane interne de l'enveloppe mitochondriale est facilité. Il a d'ailleurs été montré, qu'au niveau de ces MERCs, sont localisés des récepteurs à IP<sub>3</sub> (Krols et al. 2016). Ces IP<sub>3</sub>Rs peuvent être liés aux VDACs (Voltage Dependant Anion Channels) de la membrane externe de l'enveloppe mitochondriale par l'intermédiaire de la Grp75 (Glucose regulated protein 75) (Figure III.3; Decuypere et al. 2011). Comparant les cellules en culture HELA de phénotype sauvage (WT) et des cellules DT40 montrant un déficit en IP<sub>3</sub>Rs, il a été montré que la présence d'IP<sub>3</sub>Rs diminue la distance moyenne entre les saccules de réticulum endoplasmique et la mitochondrie suggérant un rôle important de ces récepteurs dans la formation même de ces MERCs. De plus, dans cette même étude, en mesurant la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> et la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mito</sub> (concentration en calcium mitochondriale) la démonstration fut faite que les IP<sub>3</sub>Rs permettent de faciliter le transfert de Ca<sup>2+</sup> du cytosol vers la mitochondrie (Bartok et al. 2019).

Figure III-3 : Les MERCs lieux d'échanges calciques.

Images TEM représentant des MERCs entre des citernes de réticulum endoplasmique et des mitochondries (vert). Les extrémités des MERCs sont identifiées par des pointes de flèches violettes. (B) Schéma représentant les protéines impliquées dans les transferts de calcium et les interactions entre la membrane du réticulum endoplasmique et la mitochondrie dans les MERCs. Le lien entre la membrane du RE et l'enveloppe mitochondriale est maintenu par des mitofusines (MFN 1/2 et MFN 2), mais aussi par les protéines VAPB et PTP/PS1IMM. Les IP<sub>3</sub>Rs sont ancrés à la membrane du réticulum à l'aide des protéines PS 1/2 et Sigma 1R. IP<sub>3</sub>Rs et les VDACs interagissent ensemble avec l'aide de Grp75 permettant ainsi les échanges d'ions calcium entre les deux organelles: IMM : inner mitochondrial membrane ; OOM : outer mitochondrial membrane (Adaptée de Krols et al. 2016).



Dans les pieds astrocytaires, il a été montré qu’il existe un transfert de Ca<sup>2+</sup> à la mitochondrie par l’intermédiaire des MERCs lors de lésion vasculaire. Dans cette étude, les auteurs ont montré dans un premier temps que la mitofusine-2 (Mfn2) est une protéine essentielle à la formation de MERCs. Dans un second temps, les auteurs ont utilisé des souris knock-out pour la Mfn2 et ont montré qu’il existe un déficit de la réparation vasculaire dans les régions lésées associées à une diminution de la recapture du calcium par la mitochondrie chez les souris. Enfin, forçant l’association de la membrane du réticulum endoplasmique et de la membrane mitochondriale en utilisant un « linker » de membrane (vectorisé par un adénovirus modifié) dans les souris Mfn2KO, les auteurs ont observé la restauration de la capture du calcium par la mitochondrie, de même que la restauration de la réparation vasculaire dans les régions lésées (J. Göbel et al. 2019). Le RE et la mitochondrie peuvent donc agir en synergie pour assurer des fonctions essentielles de l’astrocyte grâce à la modulation de la signalisation calcique de ces cellules.

## INTRODUCTION

### III.A.4. Morphologie de l'astrocyte et localisation des compartiments intracellulaires :

Les organelles, telles que la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, sont donc impliquées dans la signalisation calcique astrocytaire. Cependant, une question reste en suspens : où sont localisées ces organelles dans la structure si complexe de l'astrocyte ?

De façon intrigante, il existe des preuves de morphologies complexes de mitochondries et de RE dans les astrocytes *in situ*, où l'on a constaté que ces organelles atteignent des processus éloignés du corps cellulaire et des processus de pieds terminaux (J. Göbel, Motori, et Bergami 2018; Jackson et Robinson 2015; Lovatt et al. 2007 ; Mathiisen et al. 2010 ; Motori et al. 2013). Grâce à la microscopie électronique sur des coupes sériées, une étude a montré une impressionnante reconstruction 3D des extrémités périvasculaires avec de longs faisceaux de mitochondries (Mathiisen et al. 2010). Dans ces structures périvasculaires, de longs feuillettes de RE lisse et rugueux sont trouvés entre les mitochondries et la lame basale située autour de la cellule endothéliale, formant une structure semblable à un mur empêchant les mitochondries d'interagir directement avec la lame basale (J. Göbel et al. 2019). En fait, dans les astrocytes, on trouve souvent des tubules de RE autour des mitochondries dans les branches et les PAP. Cependant, une divergence sur la présence de ces organelles dans les processus astrocytaires périphériques (PAPs) et dans d'autres processus vraiment fins (diamètre inférieur à 200nm) demeure.

Ainsi, des travaux récents sur des coupes sériées en microscopie électronique affirment que les feuillettes très fins sont dépourvus de réticulum endoplasmique et de mitochondrie. Ces travaux ont été réalisés dans l'hippocampe de rat où les auteurs ont reconstruit un fragment astrocytaire d'un volume de 393  $\mu\text{m}^3$  (Gavrilov et al. 2018 ; Patrushev et al. 2013). Plus récemment, l'étude de la morphologie des PAPs astrocytaires dans le cortex de jeunes souris (4 semaines) avec des images SBF/MEB a montré que ces structures contenaient du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Dans cette étude, les prolongements cytoplasmiques ont été discriminés en fonction de leur diamètre : leaflets (diamètre < 250 nm), branchlets (diamètre > 250-800 nm) et branches (diamètre > 800 nm). Les auteurs ont observé

### Chapitre III – La signalisation calcique Astrocytaire

que les branches, branchlets et leaflets contenaient du RE et des mitochondries, mais en quantité différente. Les leaflets contenaient moins mitochondrie (MT ; 1,7-1,8%) ou RE (11,4-14,8%) en comparaison aux branches (RE : 61,0-67,0%/MT : 67,0-72,0%) et aux branchlets (RE : 39,1-54,4%/MT :18,0-18,7%) (Aboufares El Alaoui et al. 2021).

## INTRODUCTION

### III.B. Les acteurs de la membrane plasmique dans la signalisation calcique :

La signalisation calcique peut être en partie engendrée par des protéines membranaires telles que des canaux ioniques ou des récepteurs couplés à la protéine G. Chacune de ces protéines membranaires semble être impliquée dans la communication entre les neurones et les astrocytes. Nous allons voir tout d'abord que des récepteurs couplés à la protéine G permettent une signalisation calcique dépendante du réticulum endoplasmique. Ensuite, nous verrons que certains récepteurs ionotropiques au glutamate présents au niveau de la synapse pourraient aussi être retrouvés au niveau de la membrane plasmique de l'astrocyte et que ces derniers pourraient donc être impliqués dans la signalisation calcique astrocytaire. Enfin, nous verrons qu'il existe d'autres canaux calciques, qui ne sont pas dépendants du glutamate, qui sont aussi importants dans cette signalisation dans les astrocytes de l'hippocampe.

#### III.B.1.i. Les récepteurs couplés aux protéines G :

Dans les astrocytes, on retrouve aussi des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs peuvent engendrer la libération de calcium des stocks intracellulaires en réponse à l'activité neuronale. Le plus souvent, cette cascade de signalisation passe par l'activation de la phospholipase C (PLC) par la protéine G activée suite à la fixation du ligand sur le récepteur. Cette activation entraîne la libération d'IP<sub>3</sub> permettant une libération de calcium au niveau du réticulum endoplasmique médié par les récepteurs IP<sub>3</sub>R. Ces récepteurs sont des cibles de choix dans l'étude de la signalisation astrocytaire déclenchés par l'activité neuronale.

##### (a) Les récepteurs métabotropiques au glutamate :

Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs) sont composés de trois sous-groupes ([voir section II.III.B](#)). À l'heure actuelle, les mGluRs du groupe III n'ont pas été très étudiés dans les astrocytes. De plus, ils sont très peu exprimés dans les astrocytes et leur activité n'a pas montré, jusqu'à présent, de liens avec la signalisation calcique astrocytaire (Spampinato et al. 2018). Dans le groupe II, on retrouve une expression de mGluR<sub>3</sub> dans les astrocytes. Cette expression est dépendante des stades développementaux. Leur rôle dans la signalisation calcique astrocytaire chez de jeunes souris à 10 jours fut décrit dans le cortex par la délétion conditionnelle du gène dans

les astrocytes. Plus précisément, la fréquence et l'amplitude des signaux calciques observées précédemment chez la souris témoin furent diminuées (Kellner et al. 2021).

Les mGluRs du groupe I sont plus intéressants en termes de régulation calcique. Dans ce groupe on trouve les récepteurs mGluR1 et 5. Bien que le mGluR1 soit très peu exprimé dans les astrocytes, mGluR5 est quant à lui très présent en particulier au stade prénatal. L'expression de mGluR5 semble diminuer après la naissance jusqu'à atteindre des niveaux très faibles chez l'adulte (Chai et al. 2017 ; Lavielle et al. 2011). De plus, chez le rat entre P15 et P21, comme chez la souris entre P13 et P16, il a été montré que des activités calciques évoquées par l'activité synaptique au niveau de l'hippocampe était contrôlée par l'activation de récepteurs mGluR5 (Honsek et al. 2012 ; Panatier et al. 2011). Cependant, une signalisation calcique dépendante de ces récepteurs fut observée chez la souris adulte dans les PAPs (Arizono et al. 2020).

*(b) Muscarinique 1 et A1-adrenergique :*

Les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine 1 (M1) sont aussi appelés récepteurs cholinergiques, muscarinique 1. Les récepteurs alpha 1 adrenergiques sont des récepteurs aux catécholamines comme la noradrénaline et l'adrénaline. Ces récepteurs sont couplés à une protéine de classe Gq induisant l'activité Phospholipase C et provoquant ainsi la libération d'inositol triphosphate IP<sub>3</sub>, ce qui entraîne une signalisation calcique intracellulaire. Ces récepteurs ont déjà été montrés in situ comme liés à la réponse calcique astrocytaire suite à la libération de leurs ligands au niveau des synapses de l'hippocampe (Okubo 2020).

*(c) P2Y1*

Nous avons précédemment évoqué la présence de récepteurs purinergiques et leur rôle dans la modulation de l'activité de la synapse glutamatergique. Les récepteurs purinergiques de types I (P2Y1) sont des récepteurs à l'adénosine triphosphate (ATP) et l'adénosine diphosphate (ADP) se trouvant dans l'espace extracellulaire. Il se trouve que ces récepteurs sont aussi présents au niveau de la membrane astrocytaire. Il a été montré que la surexpression de P2Y1 dans les astrocytes augmente les vagues calciques astrocytaires sans affecter les microdomaines calciques (Shigetomi et al. 2018). De plus, plusieurs études ont montré un rôle important dans la régulation de l'activité

## INTRODUCTION

synaptique de P2Y<sub>1</sub>R dans le DG de l'hippocampe (Jourdain et al. 2007; Castro et al. 2011; Santello, Toni, et Volterra 2019a).

### *(d) Les récepteurs aux endocannabinoïdes*

Le système des endocannabinoïdes (ECB) est un système important dans la régulation physiologique des fonctions du cerveau. Les récepteurs aux endocannabinoïdes sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines du nom de CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> (pour revue (Piomelli 2003)). On retrouve classiquement ces récepteurs au niveau du bouton présynaptique. Les ECBs sont sécrétés par la composante post-synaptique et diffusent de façon rétrograde. En activant les récepteurs CB<sub>1</sub>Rs ils vont inhiber la transmission synaptique (Kano et al. 2009; Ohno-Shosaku et al. 2012). Ces récepteurs ont été mis en évidence comme étant des acteurs de la communication entre neurone et astrocyte dans l'hippocampe. L'activation des récepteurs CB<sub>1</sub>Rs provoquant une libération de calcium des stocks interne de l'astrocyte. Cette signalisation calcique semblant être directement liée à la potentialisation synaptique (Navarrete et Araque 2008; 2010)

### *III.B.1.ii. Les récepteurs ionotropiques au glutamate :*

Nous avons évoqué les récepteurs AMPA et NMDA dans le précédent chapitre lorsque nous décrivions la synapse glutamatergique et sa fonctionnalité. Ces récepteurs peuvent aussi retrouvés au niveau des astrocytes dans certaines régions ou certaines sous-populations d'astrocyte. On suppose donc qu'ils peuvent jouer un rôle dans la réponse calcique astrocytaire en lien avec l'activité neuronale dans certaines circonstances.

Les récepteurs fixent le glutamate ce qui provoque leur ouverture et donc une entrée de calcium au niveau de la synapse. Dans le cortex, il a été démontré qu'une activation des récepteurs NMDA de l'astrocyte provoque une augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> (Verkhratsky et Kirchhoff 2007). Ces récepteurs pourraient donc être à l'origine d'événements calciques en réponse à l'activité synaptique glutamatergique dans les astrocytes (Palygin et al. 2010), cependant l'étendue de leur importance n'est pas encore bien étudiée. De plus, ils sont exprimés de façon très hétérogène par les astrocytes. Par exemple, dans l'hippocampe, les astrocytes se montrent très peu sensibles à la présence de NMDA suggérant une très faible expression de ces récepteurs contrairement aux astrocytes corticaux (Verkhratsky et Kirchhoff 2007). Les

récepteurs AMPA sont quant à eux exprimés au niveau la glie de Bergmann dans le cervelet (Matsui, Jahr, et Rubio 2005). Leur rôle et leur expression dans l'hippocampe n'ont pas encore été élucidés, et l'hétérogénéité de leur expression n'est pas encore bien comprise (pour revue; Rose et al., 2018). Ces récepteurs ne semblent impliqués que dans une très faible portion de la réponse astrocytaire induite par le glutamate il est possible que leur rôle soit spécifique à la glie de Bergmann.

Enfin, nous avons aussi évoqué les récepteurs au kaïnate au niveau de la synapse glutamatergique, et nous avons évoqué le fait que ces récepteurs entraînent une entrée de calcium au niveau des neurones. Ces récepteurs au kaïnate sont essentiellement étudiés dans l'épileptogénèse que ce soit dans l'étude de la transmission synaptique ou dans les astrocytes. Il se trouve que pour les astrocytes, le traitement par kaïnate engendre une astrogliosis dans l'hippocampe. Les astrocytes exprimant la GFAP semblent exprimer des concentrations croissantes des sous-unités des récepteurs au kaïnate en réponse aux statuts épileptiques, et cette expression persiste jusqu'à 8 semaines après le *status epilepticus*. Cependant il n'y a pas de preuves concrètes de leur rôle dans l'activité de l'astrocyte en dehors de ces aspects pathologiques (Vargas et al. 2013).

#### *III.B.1.iii. Les canaux ioniques indépendants du glutamate :*

Certains canaux sont aussi indépendants du glutamate. Les canaux calciques ont aussi un rôle à jouer dans la signalisation calcique astrocytaire. Bien que l'on ne comprenne encore pas bien l'ampleur de leur rôle dans la signalisation astrocytaire, ces canaux permettent le transport de calcium dans le sens du gradient électrochimique transmembranaire. Différents types de canaux ioniques sont retrouvés dans le SNC et dans l'astrocyte tels que les canaux TRP ou les VGCCs (voltage gated calcium channels). Bien que le rôle des VGCCs n'est pas encore bien établi, la présence de ces canaux pourrait en particulier permettre de comprendre l'origine d'évènements calciques qui sont indépendants du réticulum endoplasmique.

L'intérêt dans l'étude des canaux TRP (transient receptor potential) est assez récent. Ces canaux sont une famille de protéines transmembranaires et l'on retrouve plusieurs de leur sous-famille dans les astrocytes : Les TRPC (canonical), par exemple, qui ont un fonctionnement analogue aux SOCEs ([voir section III.A.1.ii](#)) (Verkhatsky et

## INTRODUCTION

Nedergaard 2018) ; les TRPV (vanilloïde) et plus particulièrement les isoformes 1 et 4 qui respectivement sont exprimés dans les pieds astrocytaires de la région circumventriculaire (Mannari et al. 2013) et dans les astrocytes corticaux et hippocampaux associés à l'AQP4 (Benfenati et al. 2011); et les canaux TRPA (ankyrine), en particulier l'isoforme 1 qui est retrouvé seulement les astrocytes dans l'hippocampe (Verkhatsky, Reyes, et Parpura 2014). Une étude a d'ailleurs permis de suggérer que TRPA1 serait un régulateur de la concentration basale de calcium astrocytaire, mais aussi de la communication entre les neurones et les astrocytes par la régulation de la libération de D-serine au niveau de l'hippocampe (Shigetomi, Jackson-Weaver, et al. 2013). Plus récemment encore, cette fois-ci dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, des travaux ont montré son implication dans l'hyperactivité calcique astrocytaire et les dysfonctions synaptiques causées par le peptide amyloïde bêta. L'inhibition de ce canal permet d'ailleurs de rétablir les fonctions synaptiques causées par le peptide amyloïde bêta (Bosson et al. 2017 ; Paumier et al. 2021).

## Résumé et problématique de la thèse

Nous avons vu que l'astrocyte joue de nombreux rôles au niveau du système nerveux central et qu'au moins une partie de cette activité est finement régulée par une signalisation calcique complexe. Cette dernière est cependant spécifique à différents niveaux de l'organisation du SNC, notamment à l'échelle : (1) des différentes régions du SNC, (2) des différents réseaux astrocytaire (3) des différentes sous populations d'astrocytes au sein du tissu et (4) des différents sous-domaines morphologiques de l'astrocyte.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la suite du travail du laboratoire d'Andréa Volterra, celui-ci s'intéressant aux différentes modalités de signalisation calcique dans l'astrocyte dans ses différents sous-domaines morphologiques et ceci en fonction de l'activité neuronale (Bindocci et al. 2017). Mon travail se concentre ainsi sur la compréhension de l'organisation morphologique des astrocytes dans le tissu, mais aussi de son ultrastructure qui sous-tend l'existence de cette signalisation calcique.

En résumé, notre étude visait à :

- Identifier des corrélats ultrastructuraux des microdomaines de  $Ca^{2+}$ . Pour explorer cette question, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la localisation et de l'organisation ultrastructurale des organelles impliquées dans la signalisation du  $Ca^{2+}$  dans l'astrocyte, comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique.
- Apporter un nouvel éclairage sur la compréhension de la morphologie complexe des astrocytes, en particulier sur les processus astrocytaires les plus fins (leaflets).
- Analyser la manière dont ces sous-domaines complexes de l'astrocyte interagissent avec les synapses et la manière dont leur organisation ultrastructurale nous renseigne sur la communication neurones/astrocytes en lien avec la signalisation calcique astrocytaire.

Pour ce faire, nous avons mis en place un protocole de préparation des échantillons pour la microscopie électronique reposant sur la vitrification des échantillons pour

conserver au maximum l'intégrité du tissu et de l'astrocyte ([Article 1](#)). Nous avons ensuite acquis des images en utilisant le FIB-MEB avec un voxel isotrope de 4 nm, fournissant ainsi des volumes suffisamment grands pour étudier les différents sous-domaines de l'astrocyte avec une haute résolution dans les trois dimensions. Nous avons reconstruit et analysé ces fragments astrocytaires qui ont été imagés ainsi que les synapses voisines.

Nous avons également abordé la question de la localisation subcellulaire des sous-types d'IP3Rs dans l'astrocyte en utilisant une technique d'immunomarquage en « préembedding » associée à l'imagerie en 3D avec le MEB-FIB. Nos collaborateurs du laboratoire d'Andréa Volterra ont quant à eux exploré la signalisation calcique dans les domaines que nous avons décrits d'un point de vue morphologique ([Article 2](#)). Enfin, pour ouvrir le champ des possibles nous avons, en collaboration avec l'IGBMC de Strasbourg, exploité une partie de notre protocole d'analyse d'image pour analyser des données obtenues avec un cryo-FIB/SEM sur des cellules HELA. Si l'analyse est rendue ardue par le faible contraste obtenu sur ces échantillons non colorés, les résultats obtenus montrent néanmoins qu'il est possible d'analyser l'organisation intracellulaire et localiser des protéines de façon précise dans une cellule qui a été « simplement » vitrifiée. ([Article 3](#)).

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ce travail de thèse étant préparé sur article, la section matériel et méthodes est constituée de trois protocoles détaillés. Ils correspondent aux méthodes utilisées en microscopie électronique pour l'article 2. Leur mise en place fut une partie à part entière de mon travail de thèse. Ces trois protocoles sont formatés pour être publiés dans le journal « Bio-protocol » qui est un partenaire de stratégie de : « Science AAAS ».

Le premier de ces « Bio-protocol » correspond à la préparation d'échantillon du gyrus denté de l'hippocampe de souris en congélation haute pression et substitution à froid pour la microscopie électronique à faisceau d'ion focalisés. La préparation des échantillons fut réalisée par moi-même sous la supervision de Karin PERNET-GALLAY, la plateforme de microscopie électronique du Grenoble Institut des Neurosciences (GIN-PF ME) et en collaboration avec Anne BERTRAND (GIN-PF ME) en tant que support technique. L'imagerie FIB/SEM fut réalisée par Pierre-Henri JOUNEAU de la plateforme de nanocaractérisation au CEA de Grenoble.

Le deuxième « Bioprotocole correspond au « workflow » d'analyse d'image mis en place par Arnold FERTIN du laboratoire TIMC de Grenoble et moi-même sous la supervision de Karin PERNET-GALLAY (GIN-PF ME) et Yves USSON.

Le troisième de ces « Bio-protocol » correspond à la mise en place de stratégie d'immunomarquage a l'or pour les récepteurs IP<sub>3</sub>Rs et leur imagerie en microscopie FIB/SEM. Ce travail fut réalisé par Robin GONCET (stagiaire en étude de médecine à l'université de Grenoble) et moi-même sous la supervision de Karin PERNET-GALLAY (GIN-PF ME) et en collaboration avec Anne BERTRAND (GIN-PF ME) en tant que support technique.



# Chapitre I: Bioprotocole n°1 : Étude de l'ultrastructure 3D des astrocytes dans le tissu avec la technique de congélation haute pression et de microscopie électronique à faisceau d'ions focalisé

## **3D ultrastructural study of *in situ* astrocytes by using High Pressure Freezing and Focus Ion Beam Scanning Electron Microscopy.**

Benoit M. Lucas<sup>1</sup>, Pierre-Henri Jouneau.<sup>2</sup>, Anne Bertrand<sup>1</sup> and Karin Pernet-Gallay<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France;

<sup>2</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, IRIG, MEM, 38054 Grenoble, France;

§Current/Present address: Dept/Center, Institution name, City, Country

\*For correspondence: karin.pernet-gallay@univ-grenoble-alpes.fr

#Contributed equally to this work

**[Abstract]** Located in the brain and in the spinal cord, astrocytes are large cells with multiple cytoplasmic extensions ramified into very thin structures that are entangled into the neuronal tissue. The fine processes of these cells are difficult to observe with optical microscopy and 2D electron microscopy is not adequate to grasp the 3D organisation of the cell. In addition, conventional electron microscopy chemical preparation protocol fails to preserve the cell ultrastructure due to its high-water content. Though serial sections and block face scanning electron microscopy have made it possible to observe large fragment of astrocyte and to resolve the complexity of its thinner structures, the resolution of intracellular component was however limited. Here, brain was first fixed with an iso osmotic glutaraldehyde fixation solution and

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

sections were obtained with a vibratome; the dentate gyrus of the hippocampus was then punched and cryo-immobilised by high pressure freezing. After cryo substitution, samples were embedded in epoxy resin, semithin sections were acquired, stained with toluidine blue and visualized by optical microscopy to obtain an overview of the tissue organisation. Ultrathin sections were imaged by 2D TEM to check the quality of the sample and finally stack of images were acquired by focus ion beam scanning electron microscopy with isotropic voxels of 4 nm. This workflow provides the best level of preservation of the astrocyte ultrastructure, but also of the neurons, and allowed us, after a segmentation process, to describe the specific biological organisation of this cell and its interaction with the synapses.

**Keywords:** 3D, Astrocyte, focus ion beam, scanning electron microscopy, high pressure freezing, Cryo-substitution, ultrastructure.

**[Background]** The fine structure of astrocytes has been deciphered by 2D electron microscopy (EM) (Alan Peters, Palay, et Webster 1991). However the investigation of their interactions and their 3D organisation required the development of 3D EM. The first approach was based on the collection of serial section (Gavrilov et al. 2018; Patrushev et al. 2013; Witcher et al. 2009), but in addition to being a tiresome process, the alignment of the images is not straightforward and the z resolution is limited to the thickness of each slice. Recently, the development of field emission gun for the extraction of the electron has greatly increased the resolution of the Scanning Electron Microscopy (SEM), down to 3 nm, and the use of backscattered electron detectors clearly provides ultrastructural information of chemically stained biological samples. It is therefore possible to image serial sections with a SEM, a technique called array tomography, but again, the z resolution is limited to the thickness of the slice (Kim et al. 2020).

Since more than 10 years, development of 3D electron microscopy strategies based on the scanning electron microscope to image not slices but the surface of the sample combined with a slicing device inside the microscope makes it possible to obtain a stack of images by an iterative slicing/imaging process. The first strategy called serial block face SEM (SBF-SEM) is based on the insertion of an ultra microtome inside the

SEM chamber : with this approach the alignment of the images is much easier and the collection of the data is made automatically, however, the z resolution is limited to the thickness of the slices obtained with the diamond knife (Aten et al. 2022). Another drawback of this technic is that it requires a heavy staining of the biological sample usually several steps of osmium tetroxide are required to obtain enough contrast and this promotes the extraction of the intracellular content of the cells. The FIB SEM microscope takes advantage of a gallium beam to remove a few nanometers of the surface of the sample; stack of images could be obtained with an isometric resolution, more importantly, the technique is compatible with cryo method of preparation (Möbius et al. 2010b).

The protocol described below is adequate for any kind of tissue and we provide a workflow to first observe the sample by optical microscopy, on toluidine blue stained section, and then by 2D electron microscopy to check the quality of the sample and define the area of interest before the sample is imaged by FIB-SEM. A preliminary aldehyde fixation step is proposed to prevent astrocyte reaction to the slicing process (Takahiro Takano et al. 2014), but this step could be skipped and acute slices could be directly cryo immobilised by high pressure. In both cases the preservation of the ultrastructure of the tissue, including the astrocyte and the neurons, was optimal. High resolution acquisition with an isotropic voxel of 4 nm provides a wide field of view of the brain tissue of around 10 $\mu$ m<sup>3</sup>, which offers the possibility to resolve the thinnest structures of the astrocyte and their interactions in 3D. Our methodology allows the recollection of precise brain regions into the sample, it is designed to be compatible with correlative optical/electron microscopy strategies relying on near infrared branding (Bishop et al. 2011) and could also be used for the study of most of the tissues .

### **Materials and Reagents**

1. C57Bl6J male mice (6-week-old, Charles River)
2. Glutaraldehyde 25% Grade 1 (Sigma, G5882-100 ml)
3. Osmium tetroxide (EMS, 19134)
4. Absolute Ethanol (VWR, 210 20816.298)
5. Uranyl acetate dehydrate (Merck, 8473)
6. Methanol (VMR, 20847-295)

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

7. Acetone (Sigma, EMSURE, 1000141000)
8. Sodium dihydrogen phosphate  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck EMSURE, 106342100)
9. di Sodium hydrogen phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, EMSURE, 1065860500)
10. Bovin Serum Albumin (Sigma, A3059)
11. Exagon (Axience SAS ; 152524)
12. Epoxy embedding medium kit (Sigma, 45359-1EA-F))
13. Chloroform (Sigma, 1024311000)
14. Soy lecithine (VWR, ICNA0210214780)
15. Tannic acid (Malinckrodt pharmaceutical, 1764)
16. Toluidine blue O (Merck, 1273)
17. Mounting medium (Vector laboratories, Vecta mount, H500)
18. Sodium tetraborate (Merck, Sigma Aldrich 71997)
19. Conductive silver paint
20. Razor blade, single edge carbon steel (EMS, Gilleron. 71961)
21. Tweezers Dumont Dumoxel N°7 (EMS, C133)
22. 50 ml Falcon tube (Corning, Dutscher. 362070)
23. 15 ml Falcon tube (Corning, Dutscher. 352096)
24. Filtration unit 0,22  $\mu\text{m}$  (Thermo scientific, Nalgen 10229090)
25. Sample holder half cylinder (Leica, 16770135)
26. Sample holder middle plate (Leica, 16770136)
27. Specimen carriers, aluminium, type B (Leica, 16770142)
28. Reagent bath (Leica, 16707154)
29. Flat embedding inserts (Leica, 16707155)
30. Aclar foils (Leica, 16707156)
31. Reagent containers 10 ml (Leica, 16707158)
32. Dispenser syringe (Leica, 16707152)
33. Feeling needles (Leica, 16707153)
34. Transfer pipet polyethylene fine tip (SAMCO, Dutscher. 43233)
35. Transfer pipet polyethylene medium tip (SAMCO, Dutscher. 43222)
36. Glass pipet (Fisherbrand, Fisher scientific, 11765098)
37. Scissors
38. Cryo-tweezers
39. Balance
40. Needles
41. Seringes
42. Clamp
43. Catheters

44. Cu/Pd squaregrid 200 mesh (EMS, G200-CuPD)
45. 2 mm punch (EMS, 69039-20)
46. Diamond knife, ultrathin section (Diatome, Ultra 45)
47. Diamond knife, semi-tin section (Diatome, Histo)
48. Diamond knife, trimming (Diatome, cryotrim 45)

## **Equipment**

1. Vibratome (Leica, VT 1000S)
2. Binocular
3. Peristaltic pump
4. Heating plate
5. Transmission electron microscope (JEOL, 1200EX)
6. Ultramicrotome (LEICA EM UC7)
7. High pressure freezing (LEICA EM HPF100)
8. Automate cryosubstitution (LEICA EM AFS2)
9. Oven (BINDER, 9010-0001)
10. ELGA Purelab
11. Platinum coater (GATAN PECS)
12. Wire saw
13. Focused ion beam – Scanning electron microscope (ZEISS CrossBeam 550)

## **Software**

1. Atlas3D module of the Atlas 5 suite (Zeiss)
2. Fiji, a distribution of ImageJ [reference Schindelin 2012]

## **Procedure**

### **A. Intracardiac perfusion and tissue collection**

1. Prepare the peristaltic pump by placing the tube and rinse it with PB 0.1M until the tube is filled and no more air bubbles are present in the tube.
2. Weight the mouse and induce anaesthesia by an intraperitoneal injection of 1 ml/kg of Exagon.
3. Open the chest cavity and insert the needle, connect to the tube and clamp it. Make a small incision in the right atrium to drain the blood during the procedure.
4. Set the peristaltic pump to obtain a flow rate of 1.80 ml/min perfuse with 50 ml of PB 0.1M.
5. Perfuse with 50 ml 1.6% Glutaraldehyde in PB 0.1M.
6. Cut the head and extract the brain from the skull.
7. Keep the brain into 1.6% Glutaraldehyde in PB 0.1M for at least 1 hour at 4°C.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

8. Fill the vibratome cuve with PB 0.1M and glue the brain on the vibratome sample holder to slice the brain in 300  $\mu\text{m}$  coronal section. Keep the slices in fixative until further process.

### **B. High Pressure freezing**

1. The day before, coat the specimen carriers with chloroform/soy lecithin (1%), let then dry them into the oven. Carve a small fiducial on the rim of the sample carrier, this fiducial will be useful to maintain the orientation of the sample for further processing.
2. In the morning, fill the HPM100 with liquid nitrogen and ethanol.
3. When the instrument is ready, make several empty “shot” to be sure that the pressure/temperature conditions are OK.
4. Wash 3 times the brain slices in PB 0.1M and put it on a glass slide.
5. Use a 2 mm in diameter punch to extract the hippocampus from the tissue and use a razor blade to make a fiducial facing the opening of the dentate gyrus (Figure I.1, A).
6. Insert the sample holder half cylinder in the high-pressure freezing device, add the middle plate as well as a 3 mm specimen carrier with a carved fiducial
7. immerse the sample in 20% BSA and transfer it in the specimen carrier (300  $\mu\text{m}$  deep). Make sure that the fiducial of the sample and the fiducial on the sample carrier are facing (Figure I.1, B/C).
8. Close the specimen carrier with the flat side of another specimen carrier that has been in contact with 20% BSA. It is important not to have any air bubble that will prevent the proper vitrification of the sample (Figure I.1, D).
9. Close the sample holder cylinder and shoot.

Tips: You can keep the samples in liquid nitrogen until the end of the freezing experiment and at the end of the procedure you can transfer the remaining liquid nitrogen from the HPM100 to the AFS.

### C. Freeze Substitution

1. In the morning, fill half of the freeze substitution device with liquid nitrogen.

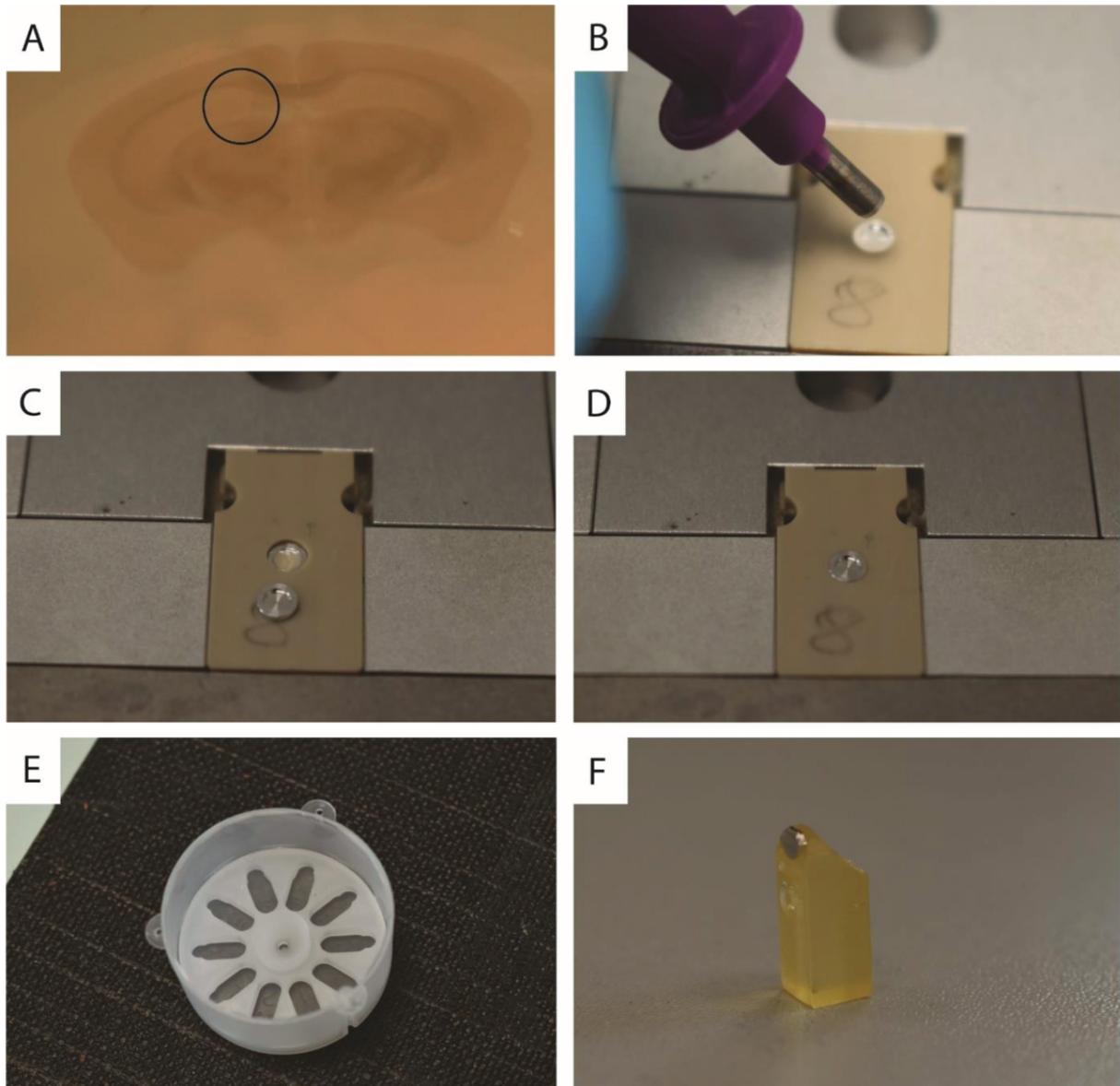


Figure I-1 : High-pressure freezing procedures.

(A) Photo of a coronal section of the mice brain. The black circle shows the punch location onto the dorsal hippocampus. (B) Photo when placing the sample from the punch into the specimen carrier. (C) Photo of the sample into the specimen carrier filled with a drop of BSA. (D) Photo of the specimen carrier sandwich closed into the cartridge. (E) Photo of the cryo substitution cuve with the embedding insert. (F) Photo of a resin embedded sample after the pyramid has been trimmed. We can see that the specimen carrier is kept.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

2. Set the machine to  $-90^{\circ}\text{C}$  and prepare the solution of Tannic acid (0.2%)/Acetone (200  $\mu\text{l}$  of 10 % Tannic Acid into 10 ml of cold Acétone). Keep the solution in the cold chamber of the AFS.
3. Place the reagent bath with the flat embedding insert (Figure I.1, E) into the chamber, transfer the sample holder cylinder in the chamber, extract the closed specimen carrier and open it with 2 pre-cold tweezers. Place each specimen carrier into different slots of the embedding insert, the open side facing up.
4. Incubate samples for a minimum of 100 hours at  $-90^{\circ}\text{C}$  into the 0.2% Tannic acid solution.
5. Prepare the 2%  $\text{OsO}_4$ / 0.1% Uranyl acetate solution in acetone (under the fume hood/ on ice). Place the solution into the chamber.
6. Wash 4-time 20 min into cold acetone by using a glass pipette (pre-cool the glass pipette with nitrogen and/or cold acetone)
7. Incubate into the Osmium/Uranyl acetate solution and launch the program.

Program details:

- Step 1:  $-90^{\circ}\text{C}$  for a minimum of 7 hours (adaptable)
- Step 2:  $-90^{\circ}\text{C}$  to  $-20^{\circ}$  by increment of  $5^{\circ}\text{C}/\text{hours}$  (14 hours)
- Step 3:  $-20^{\circ}\text{C}$  for 16 hours
- Step 4:  $-20^{\circ}\text{C}$  to  $0^{\circ}\text{C}$  by increment of  $10^{\circ}\text{C}/\text{hours}$  (2 hours)
- Step 5 :  $0^{\circ}\text{C}$  for 1 hours

8. Prepare the epoxy embedding medium according to the manufacturer protocol. Once the solution is homogenous, prepare 10 ml of 50% epoxy resin/50%acetone and put it in a reagent container
9. Place the containers into the chamber. Install the automate and insert the dispenser syringe with a filling needle and launch the following program.

Program details

- Step 1: Wash 3 times 20 minutes with acetone at  $4^{\circ}\text{C}$
- Step 2: Infiltrate with 50% Epon/acetone for 3 hours at  $4^{\circ}\text{C}$

10. Remove the reagent bath from the AFS, incubate twice the sample in 100% epon for 1 hour at RT.
11. Prepare a new batch of epoxy resin according to the manufacturer, put this "fresh" resin (which is more soluble) on the sample, place an aclar film on the samples and let it polymerise at  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 hours.

Tips: To obtain a larger resin sample re-embedded the sample into larger moulds after the embedding.

### D. Ultramicrotomy

1. Remove the embedded samples from the reagent bath and the flat embedding insert.
2. With razor blades remove the excess of epoxy resin and trim a square based pyramid around the sample (Figure I.1, F).

3. Create a fiducial by slicing one corner of the pyramid so that you can retrieve the orientation later on both the semi-thin sections and the ultrathin sections.
4. With the ultramicrotome and the trimming diamond knife cut the sample (step 500 nm; speed 50 mm/s), including the cupule, at least 500 nm in the depth of the sample
5. Slice 500 nm sections of the sample with the histo diamond knife. Use a metal loop to collect the sections and transfer them to a drop of distilled water on a glass slide.
6. Dry the slices on the slides by placing the slide on a hot plate (50-60 °C)
7. Put one drop of toluidine blue on each section
8. Heat the slide during 1-2 minutes until the rim of the drop of toluidine becomes silver/gold.
9. Remove the excess of toluidine blue from the slide with a smooth flush of distilled water
10. Dry the sections by heating the slide
11. Mount with a coverslip and mounting medium.
12. Observe with a contrast phase optical microscope

This step allows the observation of the semi-thin sections which will help you recollect your zone of interest. With a slide scanner, you can acquire images of the semi-thin sections and the coordinate of the area of interest and by that way you measured using one corner of the slice as the origin of the X/Y axis of the section.

#### **E. Transmission electron microscopy**

1. Slice the sample with the ultramicrotome and the “ultra” diamond knife and collect ultrathin section (60 nm, 1mm/s) on carbon/formvar coated copper grids, sections should be silver white.
2. With the transmission electron microscope (80 kV), find a nicely preserved area in the molecular layer of the dentate gyrus (25000 X), acquire low magnification images (5000 X) and measure the X/Y coordinates of the interesting area using Fiji software.

Tips: The granular cell layer could be distinguished from the pyramidal cells in the hippocampus. The granular cells are organized in 3-4 layers and they are rounder than the pyramidal cells from the CA1 area. The semi-thin section is helpful to find the right side of granular cell layer to image astrocytes in the molecular layer.

#### **F. Sample mounting for Focus ion beam - Scanning electron microscopy (FIB-SEM)**

1. Cut the epoxy-embedded sample with a wire saw to obtain a flat base, parallel to the surface previously sliced by ultramicrotomy, and with a sample height of less than 5 mm. Remove carefully all dust with a stream of nitrogen gas (Figure I.2, A).
2. Glue the sample to a standard aluminium stub with a drop of conductive silver paint (Figure I.2, B) (do not use carbon tape as it gives a soft fixation which is not stable enough during acquisition). Also paint each side of the sample (except the surface) with silver paint, so that the sample is as conductive as possible (Figure I.2, C/D). Let the sample dry for at least 1 hour to avoid contamination

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

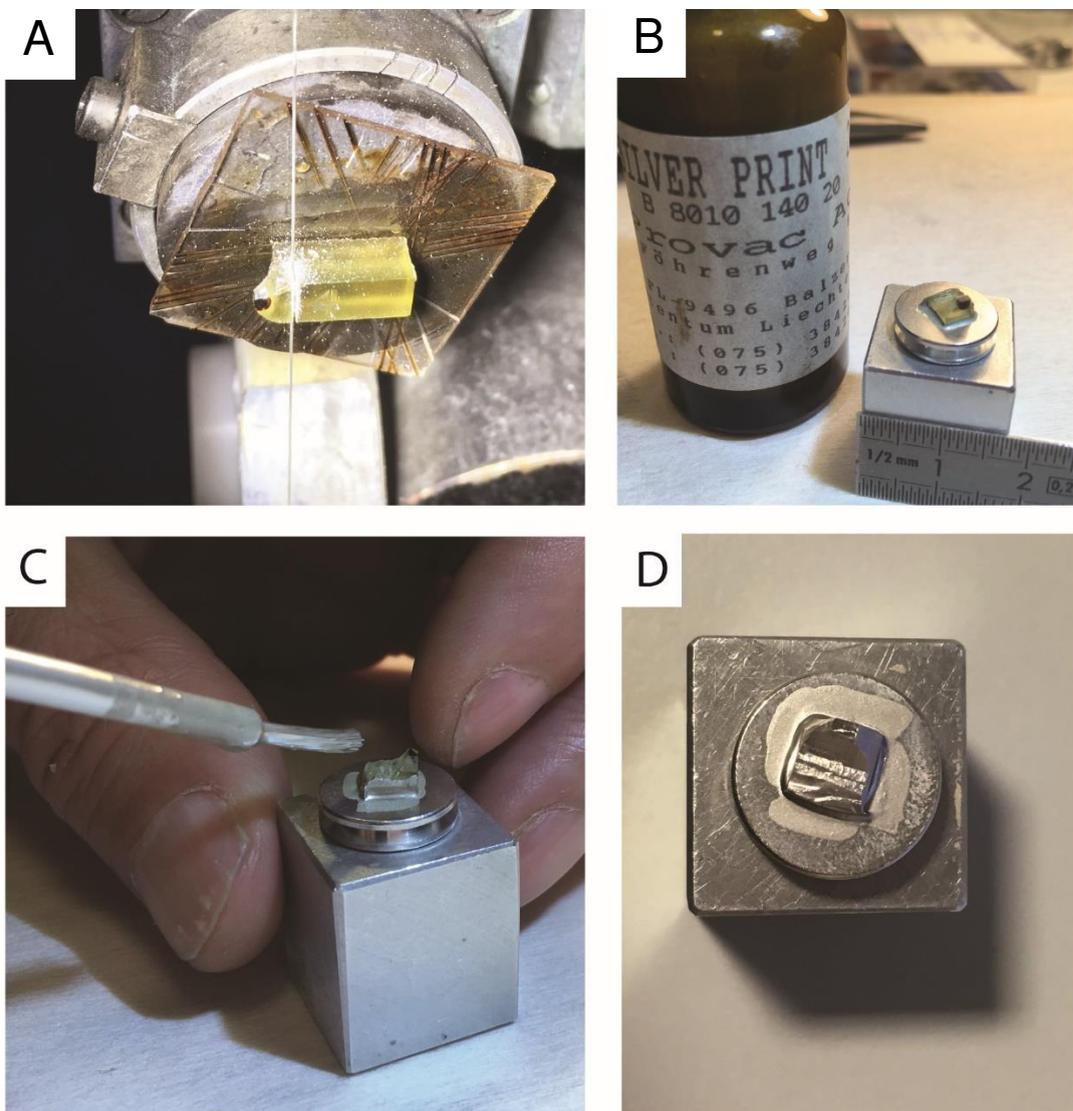
of the microscope chamber.

3. Fully coat the sample with an additional platinum layer (~10 nm Pt with ~10 min deposition of with a Gatan PECS coater used with 6 kV accelerating voltage and sample rotation) (Figure I.2, D).

Note: The purpose of this preparation step is to obtain a firm sample fixed, with the surface of interest

Figure I-2 : Sample mounting for FIB/SEM microscopy.

(A) Photo of the slicing of the epoxy embedded sample with a wire saw. (B) Photo of the sample glue on a standard aluminium and the bottle of the conductive silver paint used to glue it. (C) Photo when applying silver paint onto the sample. (D) Photo of the sample glue on the standard aluminium stub covered with silver paint and coated with platinum layers.



flat and clean, and as conductive as possible to avoid charging effects during acquisition.

**G. FIB-SEM nanotomography acquisition (Figure I.3, A)**

1. Insert the stub into the sample holder, screw it tight (important to avoid any drift during imaging) and introduce it into the FIB-SEM chamber (in our case a CrossBeam 550 from Zeiss).
2. Bring the sample surface to the eucentric position, and to a working distance of 5 mm (the distance of coincidence between the SEM and FIB beams). Tilt the sample at 54° so that its surface is perpendicular to the gallium ion beam.
3. Deposit on the surface, on a selected region of interest, a 40 x40 µm protective pad with the FIB, with two tracking lines embedded according to the process developed by Zeiss in the “Atlas3D” software. This protective pad is done in three steps:
  - A first platinum pad of ~ 1 µm is deposited (FIB current of 1.5 nA at 30 kV for ~ 1 hour).
  - A set of two converging tracking lines are milled in this platinum pad with the gallium beam (50 pA at 30 kV, for ~10 minutes). Carefully adjust the FIB astigmatism at this point to get sharp lines.
  - A second carbon pad of the same thickness of ~ 1 µm is deposited (FIB current of 1.5 nA @ 30 kV for ~30 minutes). This whole protective pad helps to limit curtaining effects during acquisition, and the tracking lines are used by the Atlas3D software to control the speed of abrasion after the acquisition of each new image.
4. Dig a large trench (50 x 30 µm) in front of this protected region of interest. This is generally done in two steps: First, dig a coarse trench with a large FIB current (typically 30 nA for about 1 hour). Then clean the surface of this trench with a lower current (typically 3 nA for about 20 minutes) (Figure I.3, B).
5. Start automatic acquisition of the image stack by continuously milling the trench surface with the FIB and imaging it with the SEM.

Different image parameters have to be chosen, resulting from a compromise between the needed spatial resolution (depending on pixel size and electron beam current), the expected total size of the imaged volume (depending on the field of view and number of images), the signal-to-noise ratio (depending on the dwell time and electron beam current), and the total time possible for the acquisition. For astrocyte imaging, this compromise is obtained with parameters close to these:

- 4 nm pixel size and 4 nm thickness slice, to obtain 4 nm isotropic voxels.
- FIB beam current of 300 nA or 700 nA at 30 kV. It is critical that the FIB aperture used to set this current is not too old (i.e., ~ 500 hours max usage), otherwise the beam will likely have a tail that could make difficult to obtain a net milling of the surface.
- SEM beam current of 1 nA at 1.5 kV (to be sure that the depth of the backscattered electron signal remains less than the milling thickness).
- SEM image field of view is of approximately 20 x 15 µm;
- Signal detection with the in-column backscattered detectors, namely the EsB detector for Zeiss

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

instruments. This detector has a front grid allowing low-energy electrons to be filtered, set at 600 V in our case.

- Dwell time of about 10  $\mu$ s.

Note: These parameters correspond to a time per image of approximately 1'30 to 2'. It turns out to be difficult to maintain good stability when the acquisition time per image becomes greater than 3' per image. As we only acquire the backscattered signal (EsB detector), image acquisition and surface milling are done simultaneously, with both the SEM beam and the FIB beam always on the sample. This mode of acquisition allows better stability because the state of charge at the surface remains more or less constant.

Tips: A control on the tracking lines is also generally done before the acquisition of each new image to check stability of the milling and correct any drift of the sample. Generally, after a stabilisation period of approximately 1 hour, the acquisition remains perfectly stable. The acquisition can then last up to about 70 hours. This total acquisition time is limited by the need to reheat the FIB filament in order to restore the FIB emission. Unfortunately, on our commercial system it is almost impossible to restart the acquisition after a source heating without losing several frames (with 4 nm slices). During the acquisition, focus and astigmatism are also corrected automatically, typically every 2 hours. We found the most accurate way to do this is by imaging a small area ( $\sim 0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ ) on the protective platinum layer with secondary electrons and a pixel size of 3 nm. The small contrast on the grains of the platinum allows a very accurate adjustment of the focus.

### **Data analysis** (Figure I.1, C)

**A detail protocol for images Segmentation and quantification in 3D: is available as Bio-Protocol IMAGE ANALYSIS.**

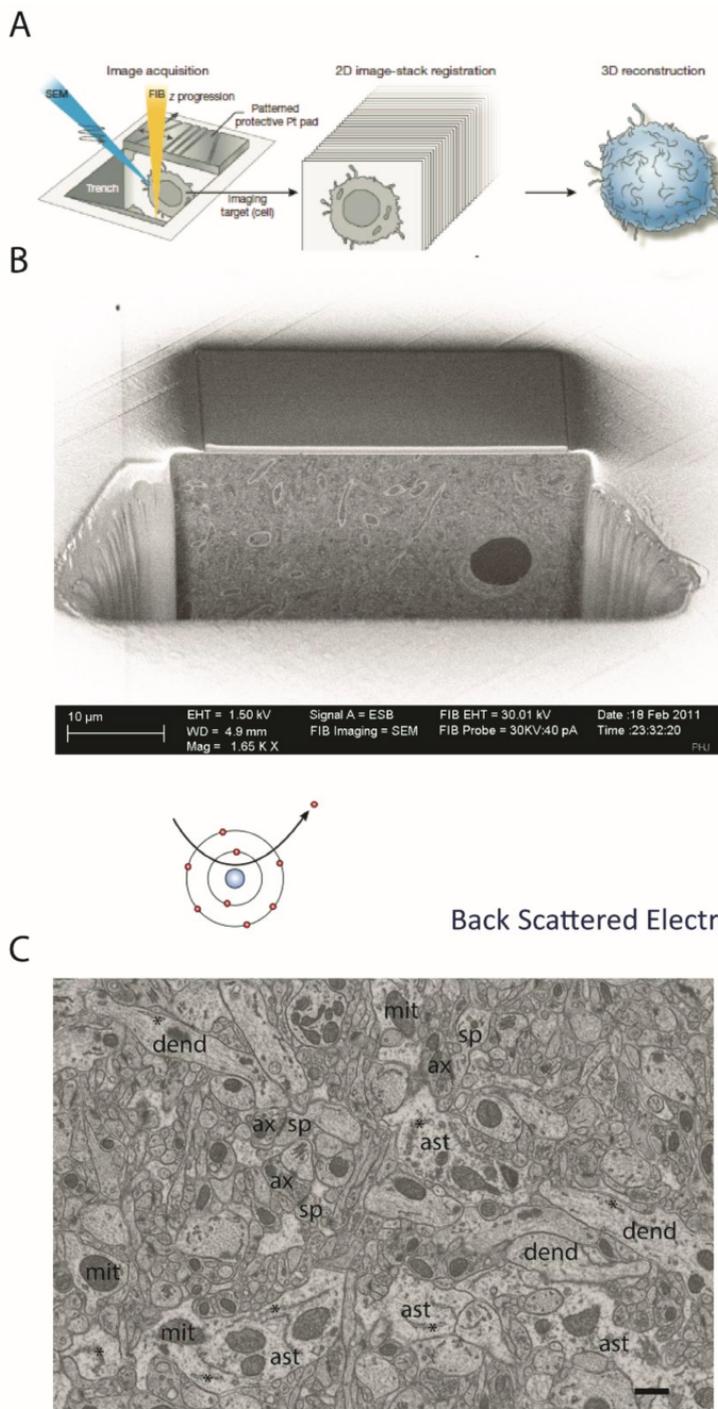


Figure I-3 : FIB/SEM imaging of the brain tissue in the mice dentate gyrus of the hippocampus.

(A) Scheme of the FIB/SEM workflow. The first step is the FIB/SEM imaging, the second step is the alignment of the stack of 2D images and the last step is the 3D reconstruction. (B) Photo taken into the chamber of the FIB/SEM with the Atlas 3D software showing the sample after digging the large trench in front of the protected region by the carbon/platinum pad. The bottom of the picture displays the parameters and the scheme representing the concept of Back Scattered Electrons. (C) Representative 2D image obtains with this protocol. dend =dendrite; ast = astrocyte; sp = spine; ax =axon;mit=mitochondria; \* = endoplasmic reticulum.

**Recipes**

- A. 0.1 M Phosphate Buffer (pH = 7.2, 50 ml)
  1. Solution A - Na2HPO4 0.5M (PM=142): Mix 35.49 g in 500 ml of ultrapure water
  2. Solution B – NaH2PO4 0.5M (PM=119.98): Mix 34.50 g in 500 ml of ultrapure water D
  3. Filter both solutions with a filtration unit 0.22µm (Millipore)

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

4. Mix 8.1 ml of solution A with 1.9 ml of solution B in 40 ml of ultrapure water
- B. 5% Uranyl Acetate/methanol (15 ml)
1. Mix 0.75 g d'acetate d'uranyl with 14.25 ml of methanol
  2. Turn it to homogenise the solution for 24 hours at 4°C
- C. 20% BSA in PB 0.1M (5 ml)
1. Mix 1 g of BSA powder into 5 ml of PB 0.1M

Tips: Place 1 ml of PB 0.1M in a 15 ml Falcon then place around 1/5 of the BSA powder and repeat that several times. Leave the falcon in the fridge overnight. The BSA powder should be perfectly diluted the day after.

- D. 10% Tannic Acid/Acetone
1. Mix 0.5 g of Tannic acid powder into 10 ml of acetone (vortex intensively until all the powder is dissolved)
- E. Pure epoxy (26 ml)
1. Solution A : 5 ml EPOXY / 8 ml DDSA
  2. Solution B : 8 ml EPOXY / 7 ml NMA
  3. Place the two solutions for 1 hour on a homogenising wheel
  4. Mix 13 ml of the solution A and 13 ml of solution B and add 1.7% of the accelerator solution (V = 442 ul) and place it on the homogenising wheel.
- F. Toluidine Blue
1. Mix 2 g of borax (Sodium Borate) in 100 ml of ultrapure water
  2. Add 1 g of Toluidine Blue O
  3. Mix until complete dissolution
  4. Filter before use

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Ethics**

Animal experimentation: All experiments were performed in accordance with the recommendations of the European Union (2010/63/UE)

### **References**

Arizono, M., Inavalli, V.V.G.K., Panatier, A., Pfeiffer, T., Angibaud, J., Levet, F., Ter Veer, M.J.T., Stobart,

- J., Bellocchio, L., Mikoshiba, K., et al. (2020). Structural basis of astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals at tripartite synapses. *Nat. Commun.* 11, 1906.
- Aten, S., Kiyoshi, C.M., Arzola, E.P., Patterson, J.A., Taylor, A.T., Du, Y., Guiher, A.M., Philip, M., Camacho, E.G., Mediratta, D., et al. (2022). Ultrastructural view of astrocyte arborization, astrocyte-astrocyte and astrocyte-synapse contacts, intracellular vesicle-like structures, and mitochondrial network. *Prog. Neurobiol.* 213, 102264.
- Bishop, D., Nikić, I., Brinkoetter, M., Knecht, S., Potz, S., Kerschensteiner, M., and Misgeld, T. (2011). Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy. *Nat. Methods* 8, 568–570.
- Gavrilov, N., Golyagina, I., Brazhe, A., Scimemi, A., Turlapov, V., and Semyanov, A. (2018). Astrocytic Coverage of Dendritic Spines, Dendritic MP, and Axonal Boutons in Hippocampal Neuropil. *Front. Cell. Neurosci.* 12.
- Kim, E., Lee, J., Noh, S., Kwon, O., and Mun, J.Y. (2020). Double staining method for array tomography using scanning electron microscopy. *Appl. Microsc.* 50, 14.
- Korogod, N., Petersen, C.C., and Knott, G.W. (2015). Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation. *ELife* 4.
- Möbius, W., Cooper, B., Kaufmann, W.A., Imig, C., Ruhwedel, T., Snaidero, N., Saab, A.S., and Varoqueaux, F. (2010). Electron microscopy of the mouse central nervous system. *Methods Cell Biol.* 96, 475–512.
- Patrushev, I., Gavrilov, N., Turlapov, V., and Semyanov, A. (2013). Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron–astrocyte communication. *Cell Calcium* 54, 343–349.
- Peters, A., Palay, S.L., and Webster, H. deF (1991). *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells* (New York: Oxford University Press).
- Takano, T., He, W., Han, X., Wang, F., Xu, Q., Wang, X., Oberheim Bush, N.A., Cruz, N., Dienel, G.A., and Nedergaard, M. (2014). Rapid manifestation of reactive astrogliosis in acute hippocampal brain slices. *Glia* 62, 78–95.
- Witcher, M.R., Park, Y.D., Lee, M.R., Sharma, S., Harris, K.M., and Kirov, S.A. (2009). Three-dimensional relationships between perisynaptic astroglia and human hippocampal synapses. *Glia* NA-NA.



## Chapitre II: Bio-protocol n°2 : Analyses d'images en 3D de l'organisation ultrastructurale de l'astrocyte en FIB/SEM

### 3D Image analysis of the astrocyte's ultrastructural organisation in the mice dentate gyrus using FIB/SEM.

Lucas M. Benoit<sup>1, #</sup>, Arnold Fertin<sup>2, #</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>1: \*</sup> and Yves Usson<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France;

<sup>2</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000, Grenoble, France.

\*For correspondence: [karin.pernet-gallay@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:karin.pernet-gallay@univ-grenoble-alpes.fr)

#Contributed equally to this work

**[Abstract]** The astrocyte is a large cell of the brain which typically contact thousands of synapses, that has specialised subdomains and which morphology is highly convolute. FIB/SEM imaging providing a wide field of view and high resolution is a preferential in the study of such cells. With the emergence of semi-automated segmentation, the 3D segmentation of large volume of astrocyte or other elements of the central nervous system became possible providing meshes for further analysis. However, the analysis of meshes using open-source software such as Blender and specific plugin such as Neuromorph (Jorstad et al. 2015) is time consuming. Our analysis workflow starts by semi-automated segmentation using the Ilastik carving workflow (Straehle et al. 2011). Segmentation masks are then extracted in NumPy (C. R. Harris et al. 2020) arrays to simplify the processing of the labelled elements. We then used the segmentation masks and Fiji plugins to analyse interaction and to obtain quantitative morphometric data about the different elements previously segmented. We

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

finished by reconstructing in 3D the different objects for representations. Our image analysis workflow allows faster analysis of wide field 3D segmentation in electron microscopy and could be used in cell biology as well as in material sciences.

**Keywords:** FIB/SEM, Astrocyte, 3D, Segmentation, Morphometry, Open-source, Python, Image Analysis, Ultrastructure

**[Background]** The recent progress in 3D electron microscopy for cell biology and neuroscience have provided huge set of data essential to study the complexity of brain-cell interactions. In the case of the astrocyte and its complexity new tools are needed to process images obtained by 3D electron microscopy. Previous studies have proven the advantage of semi-automated segmentation tools such as the Ilastik carving workflow that we use in this protocol (Calì et al. 2016). However, 3D analysis was mostly realised on meshes using open-source software such as Blender with specific plugins such as Neuromorph (Jorstad et al. 2015). It turns out that analysing interaction in the wide field of view 3D stacks of images with high resolution such as the one provides by FIB/SEM imaging can be really time consuming even on high standards computers. Our approach allow fastening the analysis analysing segmentation stacks directly.

### **Equipment**

The analysis was realised on a shared server from the Andrea VOLTERRA lab at the Department of fundamental neurosciences in Lausanne.

The server was equipped as follows:

- CPU: 16 Cores Intel Xeon® Silver 4116 CPU @ 1.100 GHz x 2
- RAM: 764 GB
- Graphic card: Radeon WX7100

### **Software**

A. Ilastik 1.3.2 (<https://www.ilastik.org/download.html>)

*Note: For the successful application of the protocol, it is important to use this exact version.*

B. Fiji with Morpholibj and 3D suit

C. Python 3 and libraries : numpy, tiff file, os, skimage

- D. Spyder (Optionnal)
- E. Python scripts :
  1. Split\_4z.py
  2. List\_ilp.py
- F. Homemade Fiji plugins :
  1. [https://github.com/a-r-n-o-l-d/Euclidean Distance Transform MT](https://github.com/a-r-n-o-l-d/Euclidean-Distance-Transform-MT)
  2. [https://github.com/a-r-n-o-l-d/Phase Only Correlation](https://github.com/a-r-n-o-l-d/Phase-Only-Correlation)
  3. <https://github.com/a-r-n-o-l-d/NeuroMacros>

## **Procedure**

- A. Split your stacks to fasten computation
  1. Launch "Split4\_z.py" script
  2. Follow the steps to split your stack by two along the X and Y axis and by 350 on the Z-axis.
- B. Convert the stack from ".tiff" to ".h5" with Fiji
  1. Open the stack of images in Fiji: Click 'File' and select 'Open' or drag your file directly to the fiji toolbar
  2. Export your file as ".h5" file: Click 'File' and select 'save as' > "h5 new or replace"
- C. Semi-automate segmentation with Ilastik
  1. In ilastik in the "Create new project list" click on "Carving"
  2. Save your project ".ilp" into the desire folder
  3. In "Raw Data" click on "Add New..." > "Add separate image(s)..." and select your ".h5" file previously saved
  4. When your file is loaded go into the "Preprocessing" tab and select the "dark lines (valley filter)" then click "Run"
  5. When processing is finished, you can start the segmentation process by going to the "..." tab.
  6. Seed the object that you want to segment with the object label and the brush tool then seed background.
  7. Click on segments. Look at your object and correct it. Do as many iterations until your satisfied by the segmentation.
  8. Click on saving objects and provide a name to the object. You are able now to start with another object.
- D. Extract your segmentation in ". npy"
  1. Click right on the "Completed Segmentation (one-colour per objects)" on the left bottom of the ilastik project window and select export.
  2. In the "Image Export Options" window un "Transformation" tick the box corresponding to "Convert to Data Type" and select "unsigned 16 bits" in the pull-down list.
  3. Under the "Output file" section in pull-down list select "npz" then save it to your folder of interest.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### E. Extract the list of labels of your ilastik project

1. Run the "List\_ilp.py" scripts
2. Select you file
3. Select You save folder

Complementary information: This will save each list of objects which are in your segmentation map. Each object grey value will correspond to the row number associated with your object name.

### F. Rebuilt segmentation by fusing NumPy array with a python (example with an original stack split in four parts)

1. In python interpreter (e.g., Spyder) load the necessary library with the following command line:  
Example:

```
Import numpy as np
```

```
Import tiff file as tif
```

2. Load your numpy arrays :

Example:

```
A = np.load("Path to .npy file")
```

3. Delete the fourth dimension of the numpy arrays:

Example :

```
nA = A[:, :, :, 0]
```

4. Save each individual stack with tiff files:

Example:

```
tif.imsave("Path to saving folder + / + A.tif", A)
```

5. At this stage you have to identify each of the labels which represent the same object in two stacks which are adjacent.

6. Reattribute the same label for each individual object which is split in the adjacent stacks:

Example:

```
nA[nA== label value] = new label value
```

7. Concatenate your arrays:

Example:

```
nAB = np.concatenate((nA,nB), 1)
```

Tips: This will concatenate your arrays on the Y-axis. The axis order in python is: 0 = z; 1 = Y; 2 = x.

8. Save your arrays with tiff files:

Example:

```
tif.imsave("Path to saving folder + / + nAB.tif", nAB)
```

### G. Measurement and analysis using fiji

1. Create synapses interactions objects corresponding to the location of the synaptic clefts

- a. Create with the tool of your preference a .csv file with two columns: "Axon" and "Spines" and place each label value of axons and spines forming a synapse in adjacent cells
  - b. Run Fiji then click on the double arrow on the right of the toolbar and select the Neuro-Dist toolset (it will add the three tools in your toolbar)
  - c. Open the .tif files with the spine and pre-synaptic button segmentation
  - d. Modify the scale of your file by selecting "Properties" in the "..." pull-down menu. The scale has to be in nm.
  - e. Select the interaction toolset
  - f. In the dialog box enter your interactions distance, to compute the equivalent of the synaptic cleft we choose a distance of 60 nm
  - g. In the "Object 1" pull-down list select your pre-synaptic button segmentation mask and in the "Object 2" pull-down list select your spines segmentation mask
  - h. Click "Ok" (this will produce an interaction mask corresponding to the synaptic cleft).
2. Segregation of astrocyte subdomains (MP, Leaflets and intermediaries)
- a. Open your astrocyte segmentation mask
  - b. Duplicate it (Ctrl+Shift+D)
  - c. Go to "Plugin" > "Morpholibj" > "3D morphological filter".
  - d. In the dialog box select Erosion and Ball at:
    - 1) For MP: The equivalent of 300 nm considering your resolution in pixels
    - 2) For Leaflets: The equivalent of 150 nm considering your resolution
  - e. Go back to "Plugin" > "Morpholibj" > 3D morphological filter after selecting the Erode dataset and select dilate ball at:
    - 1) For MP: The equivalent of 350 nm considering your resolution in pixels
    - 2) For Leaflets: The equivalent of 200 nm considering your resolution
  - f. Run the "Image Calculator" in Fiji
  - g. In the dialog box select "Multiply" to multiply the "MP-Erode-Dilate" dataset with the "Astrocyte" dataset.
  - h. The result obtains correspond to the "MP".
  - i. Once again run the "Image calculator."
  - j. In the dialog box select "Mutliply" to multiply the "Leaflets-Erode-Dilate" dataset with the "Astrocyte" dataset.
  - k. The result obtains correspond to the "Leaflets"
  - l. With image calculator now subtract the "Leaflets" and the "MP" dataset from the original astrocyte to obtain the intermediary dataset corresponding to all the processes with a diameter inferior to 300 nm and superior to 150 nm

Notes: At this stage of our analysis, we realised that most of the leaflet did not contain mitochondria except for nanotubules which are specific structures. We decided to label all the intermediaries

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

containing full mitochondrial structures with the shaft compartments if they were directly opposed to another shaft. Intermediaries with no mitochondria were labelled as leaflets with the label of the adjacent leaflets. If a intermediary connects two leaflets, we choose to label the three corresponding pieces as one leaflet. We next test if by eroding these segmentation masks with a threshold of 200 nm we only kept the intermediaries which were labelled as the shaft. Our results were positives in this sense. At the end we are only segregating two astrocytic subdomains the MP corresponding to subdomains with a diameter superior to 200 nm and the leaflets subdomains with processes with a diameter inferior to 200 nm. These mean that it will be possible for further studies to adapt the protocol to obtain just these two subdomains.

### H. Quantitative analysis:

1. The morphometric analysis:
  - a. Run Fiji and open your segmentation masks
  - b. Click on "Plugin" > 3D > Geometrical measure
  - c. Save the results as ".csv"
  - d. Repeat these steps for each of your segmentation masks
2. Distance analysis:
  - a. Run Fiji and open your segmentation masks
  - b. Click on "Plugin" > 3D > 3D Distances
  - c. In the dialog box select the two stacks of objects that you want to measure the distance.
  - d. In the "Compute" drop-down list choose "All"
  - e. In the "Closet" drop-down list choose border
  - f. In the "Distances" list tick the "Border" box
  - g. Click "Ok"
  - h. Save the results as ".csv"
3. Contact site analysis:
  - a. Run Fiji and open the segmentation masks
  - b. Run the Neuro-dist toolbox as explain before
  - c. Set in "Image" > "Properties" the scale of your image in "nm"  
(Attention: Do not forget to set the nm in the corresponding boxes)
  - d. Use the Distance to tool to propagate the boarder of your label toward the inside or toward the outside of the object. For a contact between object analysis use 30 nm.
  - e. Use the "Intersec with" tools to compute the interaction sites.

Tips: The interaction tool provides interaction objects which are labelled with the value of the items in the first segmentation mask that you place in the first drop-down list. To keep the ID of the two objects that interact together you have to build two interaction maps with the two labels, then in Fiji you can

realise a 3D Colocalization analysis from 3D suit.

4. Process contacts sites with colocalization:
  - a. Open the two interaction stacks in Fiji
  - b. Click on “Plugin” > “3D” > “multi-Coloc”.
  - c. Select in the drop-down lists the two stacks
  - d. Select “All-coloc” in the third box
  - e. Save the results as “.csv”

### **Data analysis**

1. In some rare cases the segmentation process combined with the watershed split create artefacts. We considered that all structures with a volume inferior to  $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$  were artefacts and therefore have been extracted of the analysis.
2. We analysed three stacks of respectively:  $800 \mu\text{m}^3$ ,  $2532 \mu\text{m}^3$  and  $464 \mu\text{m}^3$  with an isotropic voxel of 4 nm. Each stack was acquired in the molecular layer of the dentate gyrus of the hippocampus from three different mouse.
3. Statical analysis of morphometric measurement has been detailed in the corresponding paper: ([Article 2](#))

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **References**

Cali, Corrado, Jumana Baghabra, Daniya J. Boges, Glendon R. Holst, Anna Kreshuk, Fred A. Hamprecht, and others, ‘Three-dimensional Immersive Virtual Reality for Studying Cellular Compartments in 3D Models from EM Preparations of Neural Tissues’, *The Journal of Comparative Neurology*, 524.1 (2016), 23–38 <<https://doi.org/10.1002/cne.23852>>

Harris, Charles R., K. Jarrod Millman, Stéfan J. van der Walt, Ralf Gommers, Pauli Virtanen, David Cournapeau, and others, ‘Array Programming with NumPy’, *Nature*, 585.7825 (2020), 357–62 <<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>>

Jorstad, Anne, Biagio Nigro, Corrado Cali, Marta Wawrzyniak, Pascal Fua, and Graham Knott, ‘NeuroMorph: A Toolset for the Morphometric Analysis and Visualization of 3D Models Derived from Electron Microscopy Image Stacks’, *Neuroinformatics*, 13 (2015), 83 <<https://doi.org/10.1007/s12021-014-9242-5>>

Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pietzsch, and others, 'Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis', *Nature Methods*, 9.7 (2012), 676–82 <<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>>

Straehle, C. N., U. Köthe, G. Knott, and F. A. Hamprecht, 'Carving: Scalable Interactive Segmentation of Neural Volume Electron Microscopy Images', *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention: MICCAI ... International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, 14.Pt 1 (2011), 653–60 <[https://doi.org/10.1007/978-3-642-23623-5\\_82](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23623-5_82)>

## Chapitre III: Bio-protocol n°3 : Localisation en 3D par immunomarquage à l'or en pré-enrobage des récepteurs à l'inositol triphosphate dans l'astrocyte

### **3D pre-embedding immunogold localisation of the inositol tri-phosphate receptors in the adult mice dentate gyrus of the hippocampus astrocytes.**

Lucas M. Benoit<sup>1</sup>, Robin K. Goncet, <sup>1</sup>, Anne Bertrand<sup>1</sup> and Karin Pernet-Gallay<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France;  
\$Current/Present address: Dept/Center, Institution name, City, Country

\*For correspondence: Karin.pernet-gallay@univ-grenoble-alpes.fr

**[Abstract]** IP3Rs receptors are known to control Ca<sup>2+</sup> export from the endoplasmic reticulum. These receptors are involved into numerous signalling pathways in cells. In the brain, and particularly in astrocytes IP3Rs receptors are thought to be involved in specific Ca<sup>2+</sup> signalling to control the astrocytes activity. The astrocytes being a complex cell with numerous thin cytoplasmic processes that are tangled into the neuropile is difficult to fully resolved with conventional 2D electron microscopy or by high resolution optical microscopy. Previous study has used specific proteomic and RNA analysis to show the presence of IP3Rs receptors expression in astrocyte, however, these studies did not allow yet the precise subcellular localisation of these receptors. Immunogold pre-embedding methods and high-resolution 3D electron microscopy allow the recollection of the finest structures of the astrocyte and the subcellular localisation of IP3Rs receptors in the astrocyte. Herein, we described single pre-embedding protocols followed by either conventional chemical preparation or high pressure freezing followed by cryo-substitution for precise localisation of IP3Rs in the thinnest structures of the astrocytes. We also show the compatibility of this preparations with a focus ion beam scanning electron microscopy for 3D description of the subcellular localisation of this protein. This protocol optimised the conservation of the ultrastructure of the astrocytes and is compatible with 3D reconstructions and analysis.

**Keywords:** Pre-embedding, FIB/SEM, Astrocyte, Immunogold, IP3Rs, 3D

**[Background]** IP3 receptors are known to be in charge of Ca<sup>2+</sup> export from the endoplasmic reticulum. These receptors are involved into numerous signalling pathways in cells (Berridge, 1993; Bosanac et al., 2002). In the brain, and particularly

## MATÉRIELS ET MEHODES

in astrocytes IP3 receptors are thought to be involved in specific Ca<sup>2+</sup> signalling to control the astrocytes activity (Sherwood et al., 2021). Previous studies, used transcriptomic (Chai et al., 2017; Clarke et al., 2018) and proteomic (Chai et al., 2017) showing the expressions of IP3Rs in the mice hippocampus astrocytes, however, these technic did not allow for precise localisation of these receptors in the hippocampal tissue and for precise subcellular localisation in the astrocytes. Specific molecules such as heparin allow the observation of specific phenotypes when IP3Rs were blocked suggesting an important role of these receptors in the physiological role of the astrocyte (Sherwood et al., 2017).

We used ultra-small gold secondary conjugates (Nanogold®) in combination with silver enhancements to facilitate the labelling deeper into the tissue. We then used reduced osmium protocol with a high-pressure freezing and cryo-substitution or conventional chemical preparation to maintain our labelling. Labelled samples are then images with transmission electron microscopy to recollect the precise coordinate for FIB/SEM imaging. Thus, our protocol of immunogold pre-embedding combined with high-pressure freezing and high-resolution FIB/SEM allow the precise subcellular localisation of IP3 receptors in the finest processes of the astrocytes. This protocol can be used for correlative light electron microscopy, combining Ca<sup>2+</sup> imaging technic and the localisation of proteins to understand the organisation and activity Ca<sup>2+</sup> microdomains in the astrocytes.

### **Materials and Reagents**

1. C57Bl6J male mice (6-week-old, Charles River)
2. Glutaraldehyde 25% Grade 1 (Sigma, G5882-100 ml)
3. Osmium tetroxide (EMS, 19134)
4. Ethanol Absolu (VWR, 210 20816.298)
5. Uranyl acetate dehydrate (Merck, 8473)
6. Methanol (VMR, 20847-295)
7. Acetone (Sigma, EMSURE, 1000141000)
8. Sodium dihydrogen phosphate NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck EMSURE, 106342100)
9. di Sodium hydrogen phosphate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, EMSURE, 1065860500)
10. Bovin Serum Albumin (Sigma, A3059)
11. Exagon (Axience SAS ; 152524)
12. Epoxy embedding medium kit (Sigma, 45359-1EA-F))
13. Chloroform (Sigma, 1024311000)
14. Soy lecithine (VWR, ICNA0210214780)
15. Tannic acid (Malinckrodt pharmaceutical, 1764)
16. Toluidine blue O (Merck, 1273)
17. Mounting medium (Vector laboratories, Vecta mount, H500)
18. Sodium tetraborate (Merck, Sigma Aldrich 71997)

19. Conductive silver paint
20. Razor blade, single edge carbon steel (EMS, Gilleron. 71961)
21. Tweezers Dumont Dumoxel N°7 (EMS, C133)
22. 50 ml Falcon tube (Corning, Dutscher. 362070)
23. 15 ml Falcon tube (Corning, Dutscher. 352096)
24. Filtration unit 0,22 µm (Thermo scientific, Nalgen 10229090)
25. Sample holder half cylinder (Leica, 16770135)
26. Sample holder middle plate (Leica, 16770136)
27. Specimen carriers, aluminium, type B (Leica, 16770142)
28. Reagent bath (Leica, 16707154)
29. Flat embedding inserts (Leica, 16707155)
30. Aclar foils (Leica, 16707156)
31. Reagent containers 10 ml (Leica, 16707158)
32. Dispenser syringe (Leica, 16707152)
33. Feeling needles (Leica, 16707153)
34. Transfer pipet polyethylene fine tip (SAMCO, Dutscher. 43233)
35. Transfer pipet polyethylene medium tip (SAMCO, Dutscher. 43222)
36. Glass pipet (Fisherbrand, Fisher scientific, 11765098)
37. Scissors
38. Cryo-tweezers
39. Balance
40. Needles
41. Seringes
42. Clamp
43. Catheters
44. Cu/Pd squaregrid 200 mesh (EMS, G200-CuPD)
45. 2 mm punch (EMS, 69039-20)
46. Diamond knife, ultrathin section (Diatome, Ultra 45)
47. Diamond knife, semi-tin section (Diatome, Histo)
48. Diamond knife, trimming (Diatome, cryotrim 45)
49. HQ Silver, Silver enhancement kit (Nanoprobe, 2012-45ML)
50. Normal Goat Serum (NGS; Abcam, ab7481)
51. Primary antibody Rabbit anti-IP3Rs (MERCK 07-1210)
52. Secondary antibody Nanogold®-IgG Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (min X Hu, Ms, Rat Sr Prot)  
(Nanoprobe, 2003-1ML)

## **Equipment**

## MATÉRIELS ET MEHODES

1. Vibratome (Leica, VT 1000S)
2. Binocular
3. Peristaltic pump
4. Heating plate
5. Transmission electron microscope (JEOL, 1200EX)
6. Ultramicrotome (LEICA EM UC7)
7. High pressure freezing (LEICA EM HPF100)
8. Automate cryosubstitution (LEICA EM AFS2)
9. Oven (BINDER, 9010-0001)
10. ELGA Purelab
11. Platinum coater (GATAN PECS)
12. Wire saw
13. Focused ion beam – Scanning electron microscope (ZEISS CrossBeam 550)

### **Software (if any)**

1. Atlas3D module of the Atlas 5 suite (Zeiss)
2. Fiji, a distribution of ImageJ (Schindelin 2012)
3. I-TEM (Olympus)

### **Procedure**

- A. Intracardiac perfusion and tissue collection
1. Prepare the perfusion pump by placing the tube and rinse it with PB 0.1M until the tube is filled and no more air bubbles are present in the tube.
  2. Weight the mouse and induce anaesthesia by an intraperitoneal injection of 1 ml/kg of Exagon.
  3. Open the chest cavity and insert the needle connects to the tube and clamp it. Make a small incision in the right atrium to drain the blood during the procedure.
  4. Set the peristaltic pump on position one, perfuse with 50 ml of PB 0.1M.
  5. Perfuse with 50 ml 2.5% Paraformaldehyde/ 0.5% Glutaraldehyde in PB 0.1M.
  6. Cut the head and extract the brain from the skull.
  7. Keep the brain into the fixative for at least 1 hour at 4°C.
  8. Fill the vibratome cuve with PB 0.1M and glue the brain on the vibratome sample older to slice the brain in 300 µm horizontal section. Keep the slices in fixative until further process.
- B. Immunogold labelling
1. Use a 2 mm of diameter punch to extract the hippocampus from the tissue and use a razor blade make a fiducial facing the opening of the dentate gyrus.
  2. Wash samples 3 times 10 minutes in PBS.
  3. Incubate samples into permeabilization/blocking solution composed of: 5% NGS and 0.1% Saponin in PBS, for 30 minutes.
  4. Wash samples 3 times 10 minutes in PBS
  5. Incubate the samples overnight or 8 hours minimum at 4°C in the primary antibody diluted in PBS-0.2% NGS +0.05 Saponin (see table for dilution of each antibody)

6. Wash 6 times 10 minutes the sample in PBS at 4°C
7. Incubate the samples for 4 hours at 4°C with the Secondary antibody Nanogold®-IgG Goat anti-Rabbit IgG (1:200)
8. Wash 3 times 10 minutes in PBS then 3 times 10 minutes in PB
9. Incubate in 2% Glutaraldehyde/PB 0.1M solution for a minimum of 30 minutes at 4°C
10. Wash the samples 4 times 10 minutes in distilled water.
11. Prepare enough volume to incubate your samples respecting that you will first mix one drop of the solution A with one drop of the solution B then add the same amount of drop of solution C and mix. Incubated the samples in this solution in darkness for at least 8 minutes.

Tips: Here the duration is informative, it is possible that your kit in function of the different lab conditions reacts slowly. To check if you observed a good reaction a properly stained sample will appear more brownish than a control. If it is not the case does not hesitate to reperform this step.

12. Stop reaction in distilled water.
13. Wash sections twice 20 minutes in distilled water.
14. Wash sections twice 20 minutes in 0.1M PB

Tips: at this stage you can either process the samples for high-pressure freezing and cryo substitution ([see Bio-protocol n°1](#)) or you can continue with conventional chemical preparation for electron microscopy.

## **Data analysis**

### **Recipes**

- A. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M (PM=142): Mix 35.49 g in 500 ml of ultrapure water
- B. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M (PM=119.98): Mix 34.50 g in 500 ml of ultrapure water D
- C. Tips: Filter both solutions with a filtration unit 0.22µm (Millipore)
- D. M Phosphate Buffer (pH = 7.2, 50 ml)
  1. Mix 8.1 ml of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  2. 1.9 ml of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  3. 40 ml of Ultrapure water
- E. 2% paraformaldehyde / 0.2% glutaraldehyde solution (50 ml)
  1. 2% paraformaldehyde – 12,5 ml of 8% paraformaldéhyde
  2. 0,2 % glutaraldehyde – 0,4 ml of 20% glutaraldehyde
  3. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,9 ml
  4. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 ml
  5. Purified water 27,11 ml
- F. 1% Saponin/PBS – Stock solution (10 ml)
  1. Mix 0.1 g of Saponin powder with 10 ml of PBS

## MATÉRIELS ET MEHODES

2. Use the vortex for at least one minute to homogenized the solution

### G. Antibody diluting solution (15 ml)

1. 5% NGS 0,75 ml
2. 0,05% Saponin - 0,75 ml stock solution
3. PBS 0.1M - QSP 15 ml

### H. Permeabilization and Blocking solution (15 ml)

1. 5% NGS 0,75 ml
2. 0,1 % Saponin - 1,5 ml stock solution
3. PBS 0.1 M - QSP 15 ml

### I. Post-fixation

1. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,38 ml
2. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,62 ml
3. Glutaraldehyde 2% - 0,8 ml of 20% Glutraldehyde solution

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Ethics**

Animal experimentation: All experiments were performed in accordance with the recommendations of the European Union (2010/63/UE)

## **References**

- Berridge, M.J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315–325. <https://doi.org/10.1038/361315a0>
- Bosanac, I., Alattia, J.-R., Mal, T.K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F.K., Tong, K.I., Yoshikawa, F., Furuichi, T., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiba, K., Ikura, M., 2002. Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature* 420, 696–700. <https://doi.org/10.1038/nature01268>
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J.C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P.S., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., Coppola, G., Khakh, B.S., 2017. Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* 95, 531–549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
- Clarke, L.E., Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Münch, A.E., Heiman, M., Barres, B.A., 2018. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sherwood, M.W., Arizono, M., Hisatsune, C., Bannai, H., Ebisui, E., Sherwood, J.L., Panatier, A., Oliet, S.H.R., Mikoshiba, K., 2017. Astrocytic IP3 Rs: Contribution to Ca<sup>2+</sup> signalling and hippocampal LTP. *Glia* 65, 502–513. <https://doi.org/10.1002/glia.23107>
- Sherwood, M.W., Arizono, M., Panatier, A., Mikoshiba, K., Oliet, S.H.R., 2021. Astrocytic IP3Rs: Beyond IP3R2. *Front Cell Neurosci* 15, 695817. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.695817>



# RESULTATS

## Chapitre I: Étude morphologique en microscopie électronique : comparaison de la préservation de l'astrocyte entre méthodes cryogéniques et conventionnelles

Ce premier article en préparation correspond à la première étude de mon travail de thèse. Cette étude se concentre sur la mise en place de protocoles de préparation d'échantillon pour la microscopie électronique dans le but d'obtenir la meilleure préservation de l'astrocyte. Nous nous sommes aussi intéressés à la préservation de la structure de la cellule pour la préparation de tranche de cerveau fraîche pour l'imagerie calcique et la microscopie corrélative optique et microscopique (Correlative Light Electron Microscopy (CLEM)) dans l'étude des astrocytes.

Nos résultats ont montré la formation d'œdème astrocytaire autour de la vascularisation cérébrale dû à la coupe des échantillons. Cependant nous n'avons pas observé d'impact majeur de la fixation sur le reste de la structure astrocytaire ; les différences observées entre les méthodes cryogéniques et conventionnelles étant essentiellement des membranes moins lisses et des phénomènes d'extractions cellulaires en fixation conventionnelle. La formation de cristaux de glace en méthode cryogénique peut aussi entraîner des ruptures membranaires localisées. Nous montrons l'avantage d'utiliser un protocole hybride pour la préservation de l'astrocyte. Notre étude a aussi permis de déterminer des conditions optimales dans le but d'étudier l'astrocyte en CLEM.

Dans cette étude, j'ai réalisé l'intégralité des préparations des échantillons pour la microscopie électronique et l'analyse des résultats. La préparation de tranche de cerveaux fraîche et les expériences de microscopie à bi-photon ont été réalisées par Erika Bindocci de l'équipe du professeur Andréa Volterra.

## **Morphological investigation of *in situ* astrocytes by electron microscopy comparing cryo methods with conventional epoxy embedding.**

Lucas Benoit<sup>1</sup>, Erika Bindocci<sup>2</sup> Andréa Volterra<sup>2</sup> and Karin Pernet Gallay<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut neurosciences, INSERM U1216

<sup>2</sup> Université de Lausanne, Département neurosciences fondamentales

### Introduction:

Though electron microscopy (EM) is a powerful tool to study cell ultrastructure at a nanoscale resolution, one should be careful when using this technique to study astrocytes. Indeed, EM sample preparation has long been suspected of inducing artefacts, in particular the shrinkage of the tissue following aldehyde fixation (Schultz, Maynard, et Pease 1957), cryo methods were thus developed to solve this issue. However, astrocytes are cells that have several features that have to be taken into account for sample preparation.

First, these cells have a very high-water content, with few organelles inside; this means that conventional aldehyde fixation is not as efficient as in other cells to crosslink proteins, membrane compartments and cytoskeleton elements. Indeed, cryo techniques were designed to better preserve cell ultrastructure, the possibility to vitrify small organisms in liquid nitrogen temperature while keeping them alive when unfrozen is an amazing proof of the preservation quality! However, using such an approach to study cerebral organisation (Möbius et al. 2010a) is not as straightforward as for nematodes or viruses. Indeed, tissue vitrification could only be achieved on a thickness of 300 µm, which means that rodent brain has first to be sliced in 300 µm sections before the cryo-immobilisation process, a slicing step that is also susceptible to induce the formation of artefacts at the level of the astrocyte.

This brings us to the second astrocyte feature that has to be taken into account: astrocytes are large cells that are in contact with synapses and capillaries and are sensitive to both synaptic transmission and blood flow (Marina et al. 2018; Santello, Toni, et Volterra 2019b). Actually, astrocytes are prone to react to each trauma by the

formation of an astrocytic oedema around capillaries (Castejón 1998) and cell suffering signals appears in astrocytes well before than those in neurons (Bouzat et al. 2013). One should thus not overlook the fact that slicing the brain with a vibratome could induce physiological modification in astrocytes and, possibly, morphological remodelling. Brain sectioning with a vibratome cleaves capillaries and axonal processes and immersion of the slices in ACSF modify the ion balance in the tissue, many important features that have to be taken into account. So far it seems that neurons do to suffer extensively from this preparation, since all studies regarding synaptic plasticity have been performed on acute slices (C. R. Rose et Konnerth 2001).

Of course, the integrity of the astrocyte is also a matter of concern for *in vivo* optical calcium imaging, a study has thus previously been designed to assess to which extent astrocyte can tolerate the slicing process. By characterising the astrocytes in acute slices, authors have shown that expression of several proteins are modified, among them the developmental marker nestin is, for instance, re-expressed within 90 minutes following preparation of *in vivo* vibratome slices. From a morphological point of view, authors have also observed the retraction of the very thin processes of the astrocytes (Takahiro Takano et al. 2014). Such morphological remodelling should not be underestimated, since the retraction of these thin processes is concomitant to an increase of the extracellular space.

Extracellular space is a matter of concern for several studies (Arizono et al. 2021) and data obtained by EM were thought to be an underestimate due to aldehyde crosslinking. Though this fixative has been used for conventional chemical preparation in electron microscopy for decades (Alan Peters, Palay, et Webster 1991), a recent electron microscopy study claims that such fixative not only induces a retraction of the tissue but also cause major morphological remodelling of the cells. However, to reach this conclusion, authors have compared the ultrastructural properties of adult mice cortex conventionally prepared by aldehyde perfusion fixation with brain slices cryo immobilised by HPF followed by cryosubstitution (Korogod et al., 2015). The authors observed that chemically fixed tissues have a reduced volume with a significant loss of the extracellular space; moreover a decrease in the volume of neurite and an increase of the volume fraction occupied by astrocytes was also mentioned (Korogod, Petersen, et Knott 2015). If the results obtained are strong, the conclusion that the author has drawn is a matter of debate from our point of view. Indeed, by comparing perfusion

## RESULTATS

fixed brain with cryoimmobilized slices, there are at least two parameters that have to be taken into account: fixation and slicing.

Here, we thus explored the impact of the aldehyde fixation on both the astrocyte morphology and the extracellular space on acute hippocampal slices. For this, slices were either (1) chemically fixed or (2) chemically fixed before high pressure freezing (HPF) and cryosubstitution (CS), or (3) directly cryo immobilised by HPF. Samples were either directly processed or kept in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) during 1-3 hours before fixation and/or cryo-immobilisation. All the samples at the end of the experiment were embedded in epoxy resin. The main result we obtained is that the slicing process has more impact on the morphology of the astrocyte than the fixative procedure. Finally, we also took advantage of the experimental setup to assess the effect of two-photon imaging on the preservation of the slices and investigate the possible morphological alteration induced by the “Near infrared Branding”, a strategy to carve fiducials around an area of interest with the two-photon beam for further Correlative Light EM workflow (CLEM). In overall, we did not observe severe morphological alteration, such experiments were thus not deleterious by themselves.

### Materials and Methods:

#### Preparation of acute brain slices:

6 adult mice (C57 BL/6 J, 6-7 weeks old) were anesthetized with isoflurane and decapitated. Brains were then removed and quickly placed in ice-cold slicing solution (105 mM sucrose, 62.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 7 mM MgCl<sub>2</sub>; pH was equilibrated with 5%/95% CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> gas mix. Horizontal, hemibrain slices (300 µm-thick) were cut with a vibratome.

Samples were divided into four categories: fresh samples (time = 0 hour), 1 hour in aCSF, 2 hours in aCSF and 3 hours in aCSF. Fresh samples (time=0h) were either placed directly in 1.6% Glutaraldehyde 2 hours at 4°C or rapidly transferred for high pressure freezing. The other samples were let in regular oxygenated aCSF solution (118 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 mM glucose) at 34°C. The attribution of slices for the different treatment was done semi-randomly, distributing slices along the ventro-dorsal axis in each category to avoid creating localisation bias in our analysis.

In order to preclude development of epileptiform activity in slices, aCSF contained high  $Mg^{2+}$  concentration (2 mM) and no GABA inhibitors were applied in these experiments. After 1 hour, 2 hours or 3 hours incubation in aCSF, samples were processed similarly as fresh samples. To reduced bias, slices from different positions on the ventro-dorsal axis for each preparation's conditions were selected (for more details see table 1). Each hippocampus was dissected using a circular punch with an inner diameter of 2 mm. To be able to retrieve sample orientation, the hippocampus punches were coronally sliced, so that the opening of the dentate gyrus faces this fiducial.

### Conventional epoxy embedding:

Punches were washed 3 times 10 minutes in Phosphate buffer (PB: 0.1 M, pH 7.2) before staining in 2%  $OsO_4$  in 0.1M PB. Samples were then washed extensively first with PB and then with purified water before being stained with 1% uranyl acetate in water for 1 hour in the dark at 4°C. Samples were then washed 3 times in ice-cold water and kept overnight at 4 °C. The day after, samples were dehydrated in graded alcohol series (30%, 60%, 90% and 3 times 100%) at 4°C, 10 minutes per baths. After dehydration, samples were infiltrated with 50% epoxy resin/50 % ethanol for 2 hours at room temperature and then 2 times for 1 hours in pure epoxy, all these steps were done on a rocking plate. Samples were finally placed in silicon mould, they are oriented so that the fiducial is parallel to the upper side of the mould (in the next step we want to acquire orthogonal section of the sample), after filling the mould with resin samples were let to polymerise for 72 hours at 64°C.

## RESULTATS

### High-pressure freezing and cryo-substitution:

Punches previously fixed by immersion in 1.6% Glutaraldehyde were washed 3 times 10 minutes in 0.1M Phosphate buffer, quickly immersed in 20% BSA in PB 0.1M before high-pressure freezing (Leica, HPM100) in 3 mm aluminium sample carriers (Leica, ). Fresh punches (without aldehyde fixation) were immersed in 20% BSA and transferred into 2 mm in diameter and 300  $\mu$ m deep aluminium sample holders and high pressure frozen (Leica microsystem, EM HPM 100). Frozen samples were kept in liquid nitrogen until their transfer for cryo-substitution.

Frozen samples were transferred in the cryosubstitution chamber (AFS2, Leica Microsystem) and were first bathed in 0.2% tannic acid in acetone for 72 hours at -90°C, then washed with 4 times 20 minutes in cold acetone at -90°C and incubated in 2% OsO<sub>4</sub>/ 0.1 % Uranyl acetate in acetone for 7 hours at -90°C. Then, temperature is increased from -90°C to -20°C with 5°C/hour increment steps. Samples were then kept at -20°C for 16 hours before increasing the temperature (10°C/hours) from -20°C to 0°C. Finally, samples are kept in this solution at 0°C for 1 hours, washed 3 times 20 minutes at 4°C and, outside the cryosubstitution device, samples were infiltrated with 50% Epon/50% Acetone for 3 hours at 4°C, on ice. Finally, samples (still in the specimen carrier) were placed in silicon moulds and were infiltrated 2 times for 1 hour in pure epoxy resin; at the end, the fiducial is oriented to face the upper side of the mould and the resin is let to polymerise for 72 hours at 64°C.

### Optical microscopy on semi-thin sections:

Resin-embedded samples were sectioned orthogonally. Semi-thin (500 nm thick) sections were collected on a glass slide and stained with toluidine blue ( 3 minutes, 50°C) and covered with a coverslip. Semi-thin sections were imaged using a slide scanner (Axioscan Z1, Zeiss). Measurement on optical microscopy images were realised using ZEN software (Zeiss) to directly measure the distances and extract ROI from the Axioscan Z1 acquisition with knowledge of the metadata corresponding to the setting of the Axioscan Z1.

### Electron microscopy:

Ultrathin sections (50 nm thick) were collected on carbon/formvar coated copper grids. Ultrathin sections were counter stained with uranyl acetate and lead citrate to increase contrasts. Random images of the hippocampus neuropile were acquired using a transmission electron microscope (JEOL 1200 EX) equipped with a digital camera (Olympus, Veleta). In cryo-fixed samples, regions with ice crystal damages were avoided. Quantitative analysis of TEM images was realised using the FIJI software. The magic wand tool was used to select the extracellular area and the measurement tool to measure it. The magic wand tool allows creating a selection by tracing objects of uniform colour or “threshold” objects. The area measured was normalised to the area of the field of view to obtain a % of the surface.

### Fresh brain slices preparation for correlative light electron microscopy:

Adult mice (C57 BL/6 J, 6-7 weeks old) were anesthetized with isoflurane and decapitated. Brains were then removed and quickly placed in ice-cold slicing solution (105 mM sucrose, 62.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 7 mM MgCl<sub>2</sub>; pH was equilibrated with 5%/95% CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> gas mix. Horizontal, hemibrain slices (300 µm-thick) were cut. Samples were kept in aCSF solution (118 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 mM glucose) at 34°C. In order to preclude development of epileptiform activity in slices, aCSF contained elevated Mg<sup>2+</sup> concentration (2 mM) and no GABA inhibitors were applied in these experiments.

Slices were transferred into the imaging chamber of the imaging setup for brain slices. This setup comprised a Bruker Ultima system equipped with an AOD scanner and a piezoelectric actuator with a 20x LUMPFL60X W/IR-2 NA 0.9 Olympus objective. The light source was a Chameleon Vision II Ti:Sa lasers, with 140 fs pulse duration, tuned to 920 nm and negative dispersion was optimised to the used wavelength. The laser power was rapidly modulated by a Pockels cell.

### Statistical Analysis:

All results are expressed in mean +/- SEM. Statistics were realised using the Graphpad Prism 8.4.3 software. Nested-ANOVA was realised to take into account of the inter-individual variability when normality of the distribution and homogeneity of variance were assumed. Tukey's test was used as a post-hoc test for multiple comparison.

### Results:

#### Overall preservation of the sample after the slicing.

To evaluate the impact of sample preparation on the morphology of the neuropile, we performed a methodical study to compare three fixation procedures. For this purpose, horizontal brain hemi-slices (300  $\mu\text{m}$  thick) were obtained after extraction of the brain from the anesthetized mice ( $n=6$ ) and directly sliced in cold ACSF according to two-photon calcium imaging protocol (Bindocci et al. 2017). These slices were directly processed ( $t=0$ ) and we assessed the quality of the preservation of hippocampal brain slices in three conditions: (1) aldehyde fixation of the acute brain slices followed by conventional chemical staining and epoxy embedding process (Aldehyde), (2) aldehyde fixation of the acute brain slices followed by high-pressure freezing and cryosubstitution (Aldehyde-HPF) and (3) brain slices directly cryo immobilised by HPF followed by CS (HPF).

To assess the amount of retraction of the tissues, semi-thin section (500 nm) counterstained with toluidine blue, were imaged with a slide scanner (Axioscan Z1, Zeiss) so that the slices thickness could be measured. All samples were cut at 300  $\mu\text{m}$  thick (nominal value), after embedding of the tissues their average thickness for aldehyde-HPF, aldehyde and HPF samples were respectively  $311.5 \pm 6.851 \mu\text{m}$ ;  $303.7 \pm 2.199 \mu\text{m}$  and  $303.6 \pm 2.768 \mu\text{m}$ ; no significant differences were therefore observed across treatments (one-way ANOVA;  $p\text{-value}=0.3837$ ). This result seems to indicate that if a retraction occurs, this does not depend on the 3 types of sample preparation evaluated in this study.

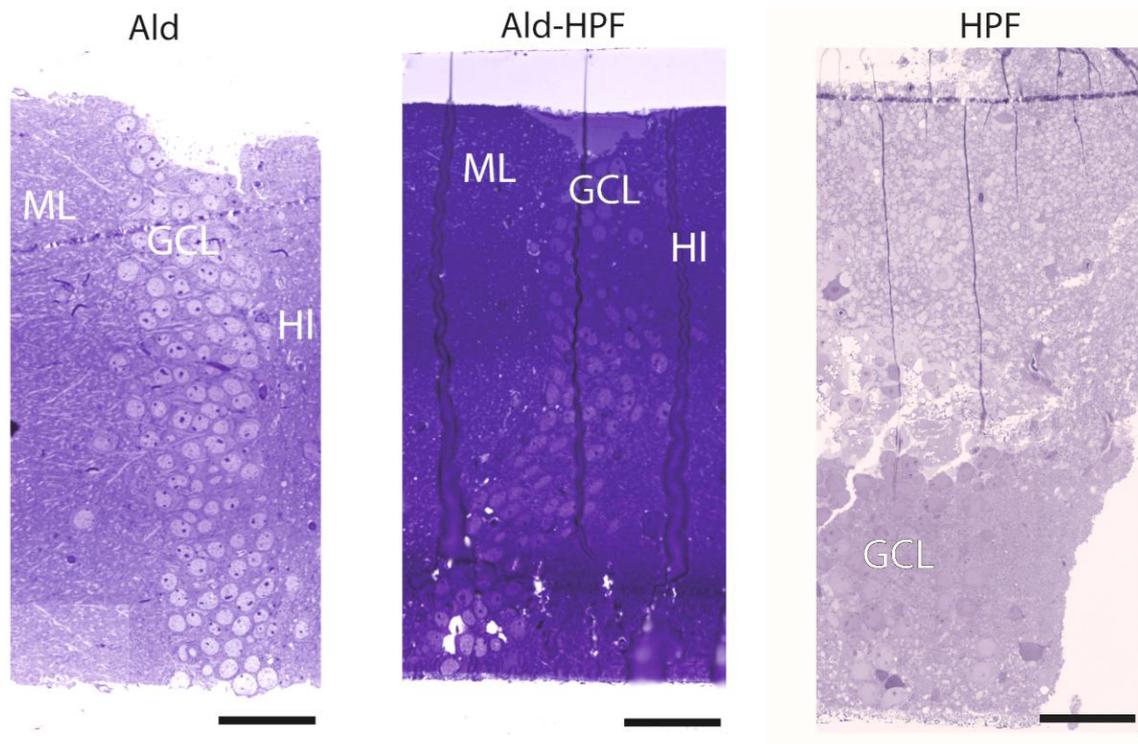


Figure I-1 : Structural preservation of the hippocampal neuropile upon three different protocols of fixation. Semi-thin sections displaying the granular cell layer of the dentate gyrus of the hippocampus in each of the treatments aldehyde (left panel), aldehyde-HPF (middle panel) and HPF (right panel). Aldehyde and aldehyde-HPF display a high level of preservation of this structure whereas HPF is well preserved in the bottom half of the slice (ML: Molecular Layer; GCL: Granular Cell Layer; HI: Hilus). Scale bars = 50  $\mu$ m

We then search signs of cell suffering in the different neuronal layer of the hippocampus (the granular layer of the dentate gyrus and the pyramidal layer of CA1) and observed that in all samples that have been high pressure frozen (Aldehyde-HPF and HPF), both the neuronal cell body and nucleus were better preserved than in the aldehyde condition as we did not observe a dark cytoplasm with a retraction of the soma. However, on the border of the slices, a few cellular bodies were sometime devoid of their cytoplasmic content and it could happen that a whole region has been damaged by the formation of ice crystal (figure 1: right panel) that caused significant disruption of cell bodies, in this case the remaining tissue appeared less dense and more oedematous.

RESULTATS

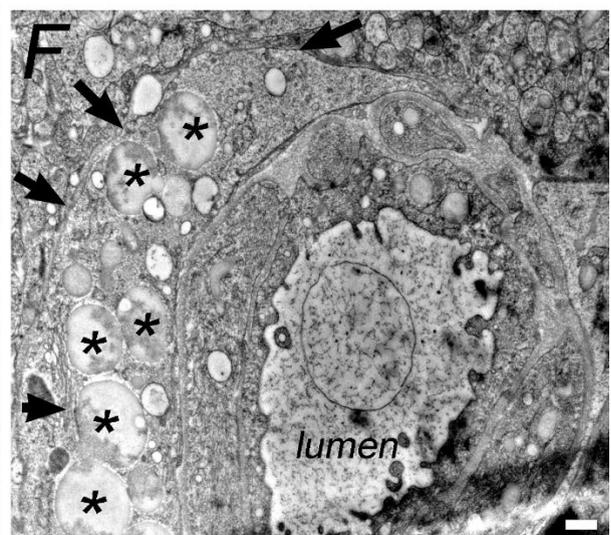
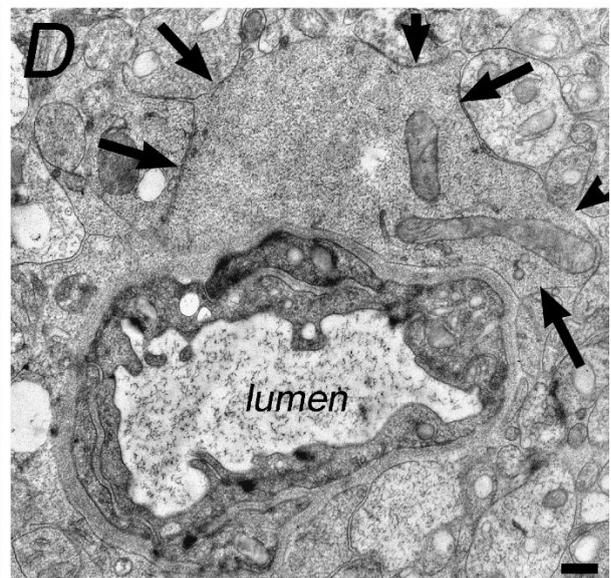
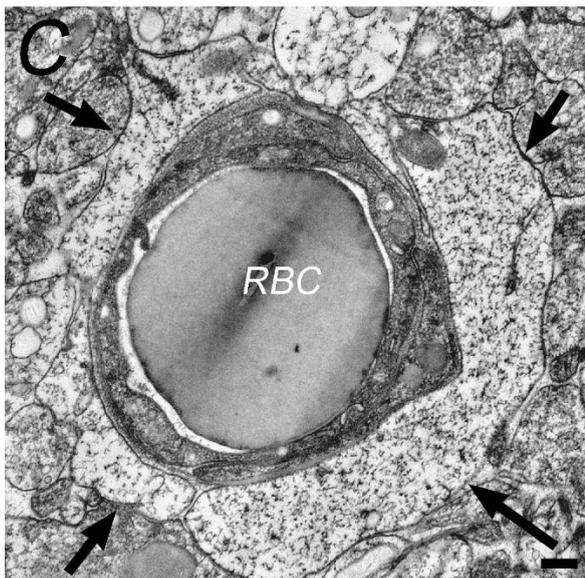
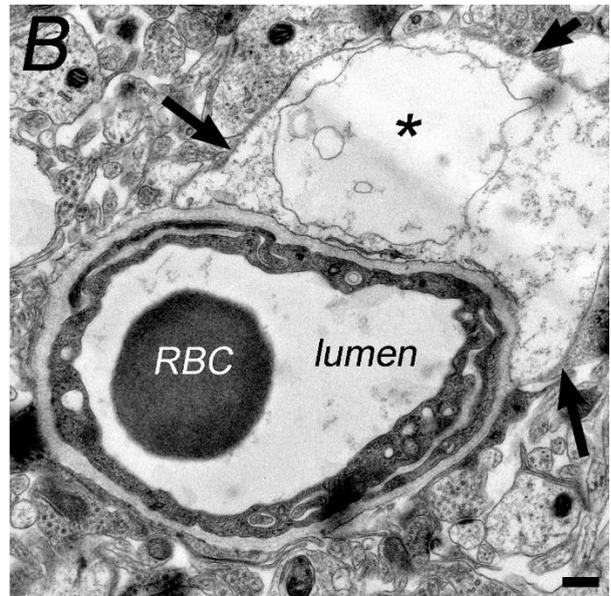
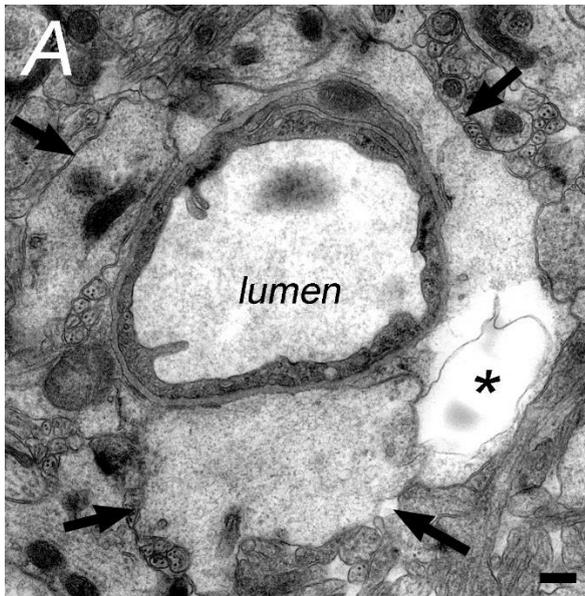


Figure I-2 Ultrastructural study of the capillaries. The presence of an astrocytic oedema is observed in the three conditions (arrows): by using aldehyde fixation protocol (A and B), the astrocytes are rarely as well preserved as in (A), most of the time, the cell seems to have lost its intracellular content and appear electron lucent (B). A vacuole is frequently observed inside the astrocytic end foot (\*) and is always devoid of content in this condition. In Aldehyde-HPF condition (C and D), the cytosolic content is preserved, sometime the astrocyte seems to be even more electron dense if compared with the surrounding neuropile (D), the membrane is smooth if compared with the aldehyde (A and B) condition (arrows). In the HPF condition (E and F), the morphology of the astrocytic end foot is preserved and content could be observed in the vacuoles (\*). RBC: red blood cells, lumen: lumen of the capillary, \* : vacuole. Bar 400 nm.

### Qualitative Assessment of the Ultrastructural Sample Preservation

We then investigated the tissue morphology on ultrathin section (50 nm) of the same samples (t=0) described above by transmission electron microscopy. From a qualitative point of view, the overall preservation was good in the 3 different preparations although we observed slight disorganisation of the neuropile on the border of the slices probably due to the slicing step.

The main featured that could be observed in the three conditions is the formation of an astrocytic oedema around the capillaries forming like a life buoy around the endothelial cells (Figure 2). The mean thickness of the astrocytic feet is around 500 nm, sometime a vacuole could be observed inside (Figure 2 A, B and F). This phenotype is independent of the fixation process, but is most probably induced by the slicing step, since such oedema are not observed in perfused rodent brains as published in the literature (Peters, Palay, et Webster 1991) but is a known phenotype in traumatic brain (Bouzat et al. 2013; Castejón 1998). Difference in the density of the cytoplasm could be observed if the different fixation conditions were compared since astrocytes are much more electrons lucent when fixed with aldehyde (Figure 3, A and B) than those fixed with aldehyde-HPF or HPF alone (Figure 3 C and D). The difference in cytoplasmic density is also striking if compared with neurons, as if part of the cytoplasmic content of the aldehyde fixed astrocyte is lost during the fixation or the embedding process.

The Drawback of the Aldehyde-HPF and HPF condition is the formation of ice crystal that disrupts the morphology. Such damages were locally observed in each sample;

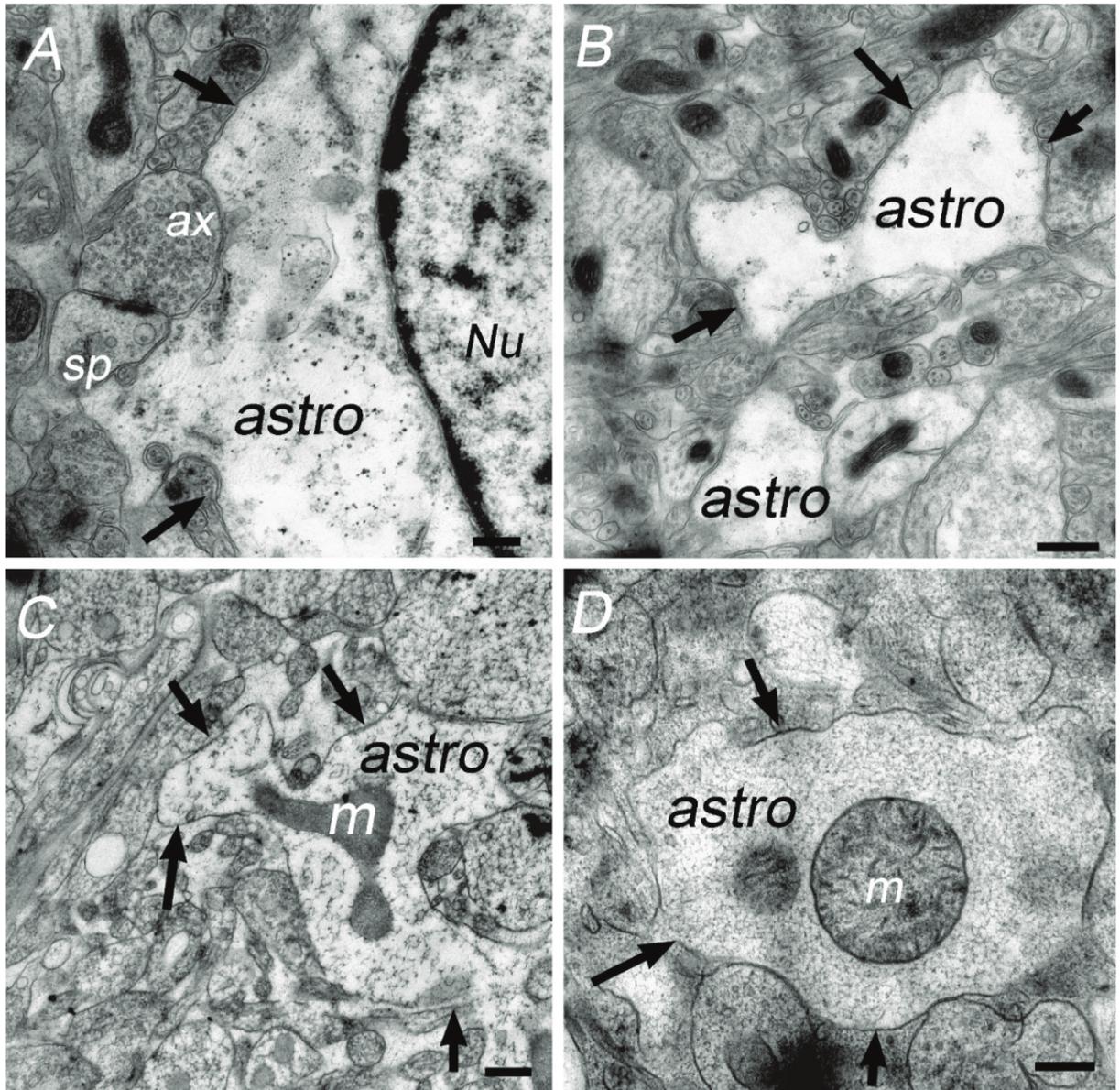


Figure I-3 : The preservation of the astrocyte cell body and major process depends on the fixation protocol. In aldehydes fixed slices (A and B), the cytosol appears electron lucent as if part of the content is lost during the embedding process. Such extraction is not observed in Aldehyde -HPF (C) and HPF (D) condition. Nu : nucleus, ax : axon, sp: spine, m: mitochondria. Bar 400 nm.

therefore, analysis was performed in better preserved area. Comparing Aldehyde-HPF or HPF samples in the region without ice crystal formation with Aldehyde samples, subtle improvement of the cell ultrastructure could be observed in addition to the better preservation of the cytoplasmic content. In HPF samples, cell membranes were smoother if compared to aldehyde samples (Figure 2, arrows) and likewise, the mitochondrial membranes have a more regular shape with distinct cristae (figure 2, C) and the content of the vacuoles present in the astrocytic endfeet is preserved (Figure 2, F). Interestingly, ice crystal formation was more recurrent in HPF samples if compared to the aldehyde - HPF condition.

### Quantification of the extracellular space in the three conditions:

We then addressed the question of the retraction of the astrocyte by measuring the percentage of extracellular space in the sample at  $t=0$ . For this large field of view were acquired randomly by transmission electron microscopy with a magnification of 15'000 times throughout the section in areas devoid of ice crystal. From a qualitative point of view, inter-individual differences were observed, and even in the same slices, extracellular space was more abundant in the centre of the slices (Figure 4, right) if compared with the borders (Figure 4, left), there was also variability in slices from the same condition that could maybe reflect variability in the slice preparation

RESULTATS

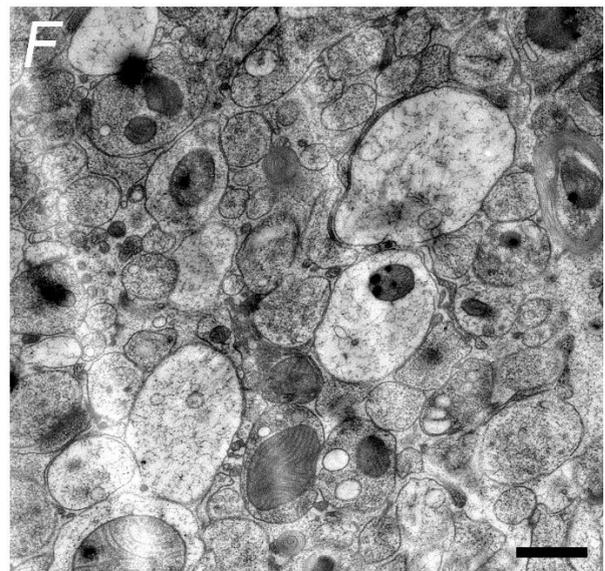
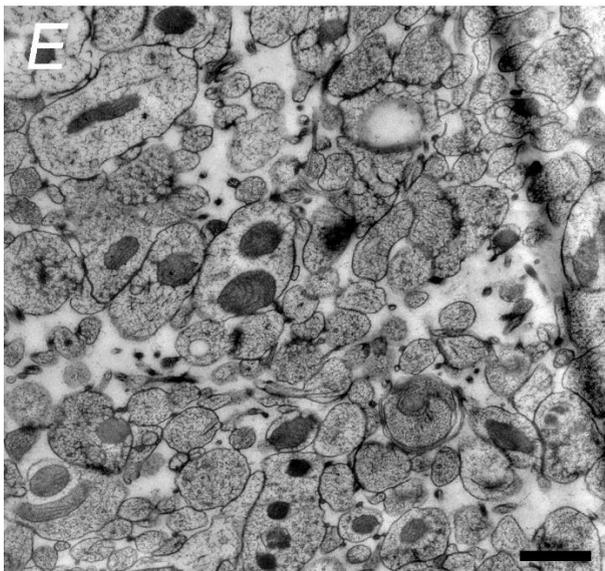
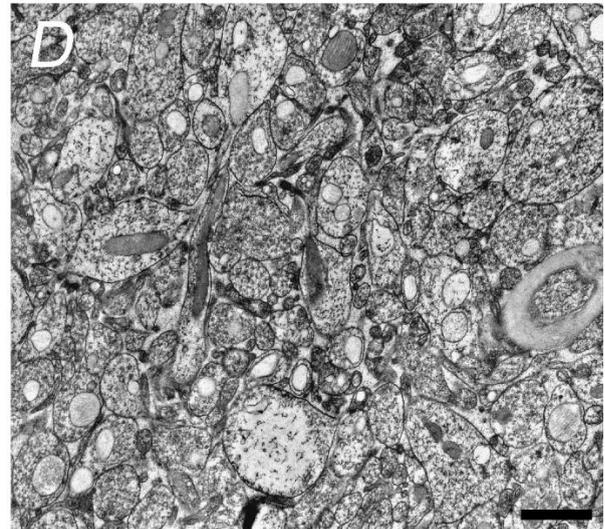
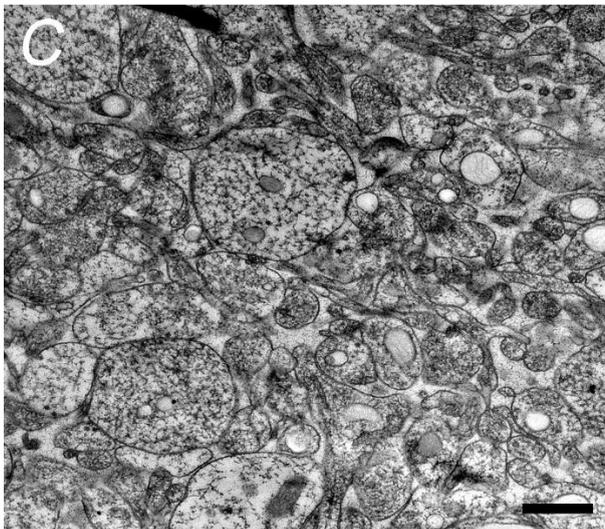
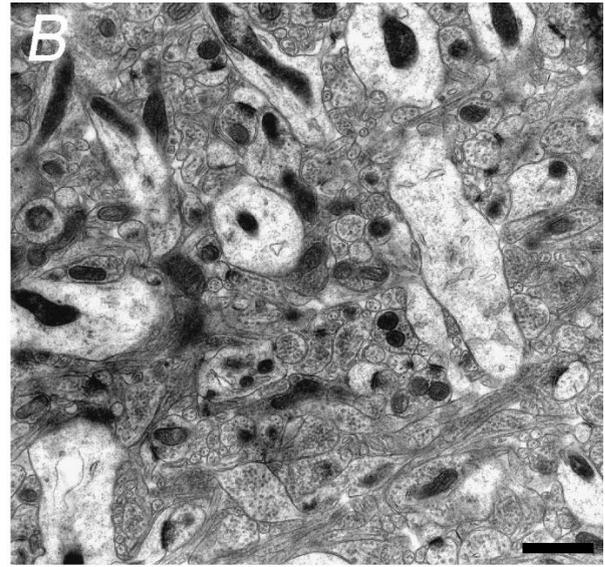
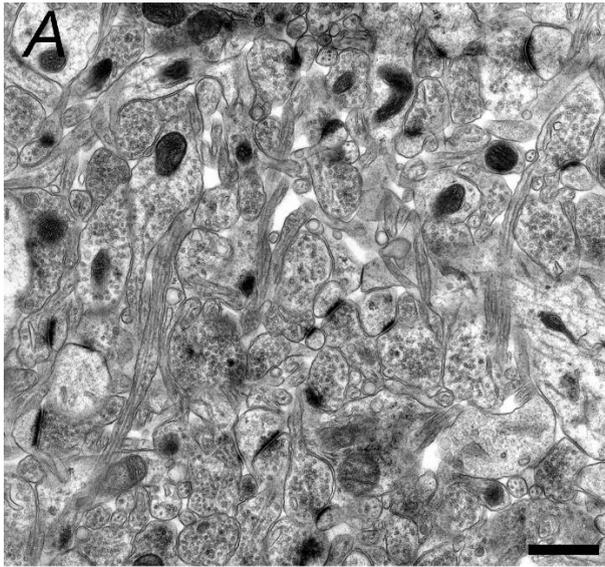
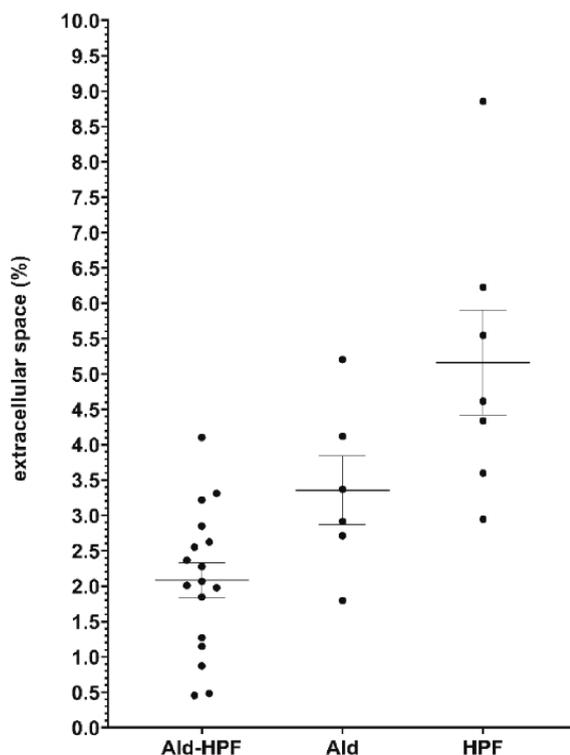


Figure I-4 : Widefield acquisition of the neuropile tissue to assess the amount of extracellular space. In the three conditions aldehyde (A and B), Aldehyde-HPF (C and D) and HPF (E and F) there are areas where the tissue seems to be more loose and where extracellular space could be observed (A, C and D) and areas where the tissue is densely packed (B, C and D). Bar 1  $\mu\text{m}$ .

To obtain quantitative data, the extracellular space was measured on each image. The average percentage of extracellular space was of  $2.13 \pm 0.30 \%$ ,  $3.35 \pm 0.31 \%$  and  $4.77 \pm 0.65\%$  for respectively aldehyde-HPF (A-HPF), Aldehyde (A) and HPF with no effect of the protocol used (n animals = 6; n samples = 9; n fields = 66; nested one-way ANOVA p-value = 0.3421); inter-individual differences were, however, observed (p-value  $<0.0001$ , Graph 1)). This results clearly shows that the fixation process is not a factor that impacts the percentage of extracellular space.



Graph 1 : The fixation protocol does not modify the percentage of extracellular space observed in the hippocampal neuropile. Graphs showing the average percentage of extracellular space upon each protocol. Analysis did not reveal any differences between groups.

### Impact of the time of immersion in oxygenated ACSF:

Another objective of this work is to evaluate the viability of the astrocytes when acute slices are kept in ACSF. For this purpose, samples were kept for 1 hour (t=1), 2 hours (t=2) and 3 hours (t=3) in oxygenated ACSF at 34°C before sample preparation accordingly to the three conditions described above. All samples have been prepared at the same time as previous experiments and were issued from the same animals (n = 6), 4 hippocampi were prepared for each treatment (Aldehyde-HPF, Aldehyde and

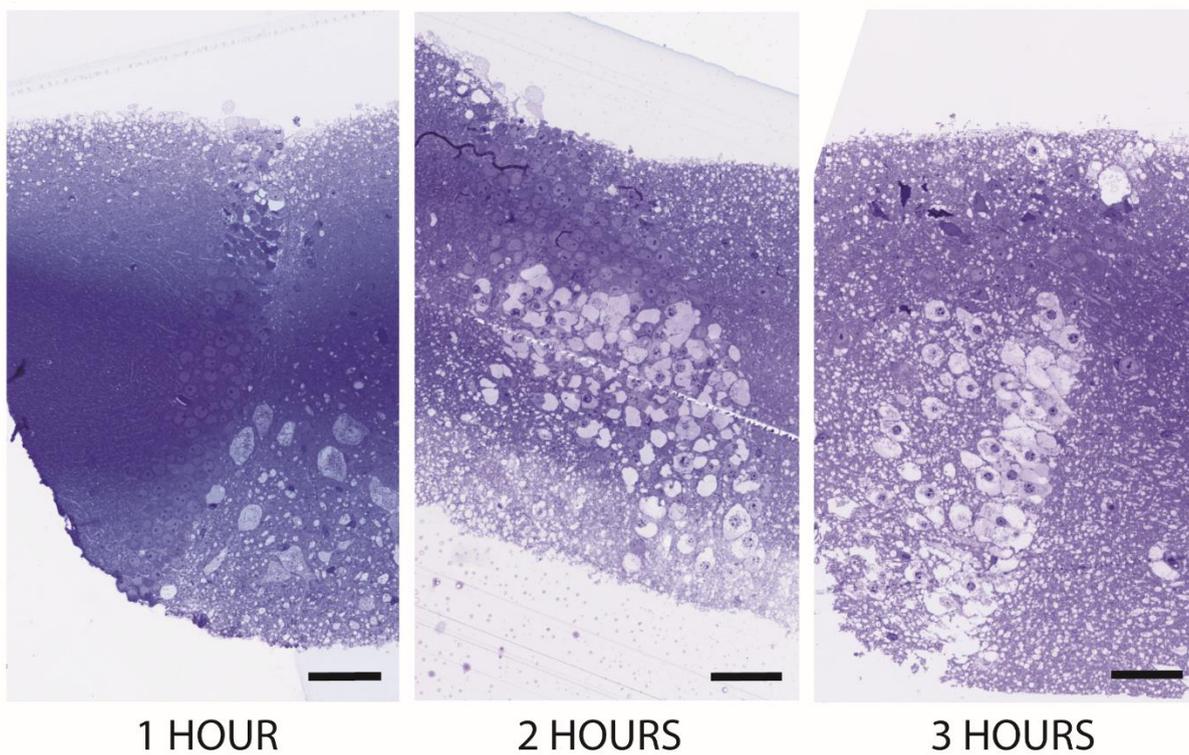
## RESULTATS

HPF) and sliced were assigned a time point semi-randomly to avoid bias caused by localisation in the brain.

A qualitative examination of semi-thin section prepared as described above, indicates an increase in the number of swollen cells with a clear cytoplasm in each treatment but with some differences. In Aldehyde samples numerous cells with a swollen “watery” like profiles are already observed in samples immersed for 1 hour in ACSF and the number of such unhealthy cell seems to increase with the time of immersion in ACSF, at three hours we also noticed the presence of retracted cells with a very dense cytoplasm (figure 5, A). In both HPF treatments, there was less evidence of such a degradation of the cell morphology and this unhealthy phenotype only appears in the slice after 2 hours in ACSF. This phenomenon propagates from the borders and the middle of the slices. We then looked at the ultrathin sections and observed the same phenotype as what we described before without immersion in ACSF.

The percentage of extracellular space was then measured according to the same strategy as described above; comparison was made with the freshly fixed brain slices ( $t = 0$ ) and between each condition. As stated above, sample with a high level of crystal formation was excluded of our analysis and all the observations have been realised 40  $\mu\text{m}$  under the surface of the slices as it is done in two-photon imaging experiments. In this tissue, no significant increase of the extracellular space was observed across the treatments in the hippocampal neuropile ( $n$  samples = 36;  $n$  fields = 229; nested one-way ANOVA  $p$ -value = 0.6312) and no interindividual differences have been detected after 1 hour ( $p$ -value = 0.1475), 2 hours ( $p$ -value = 0.488) and 3 hours in ACSF ( $p$ -values = 0.1443) (figure 5, B).

A

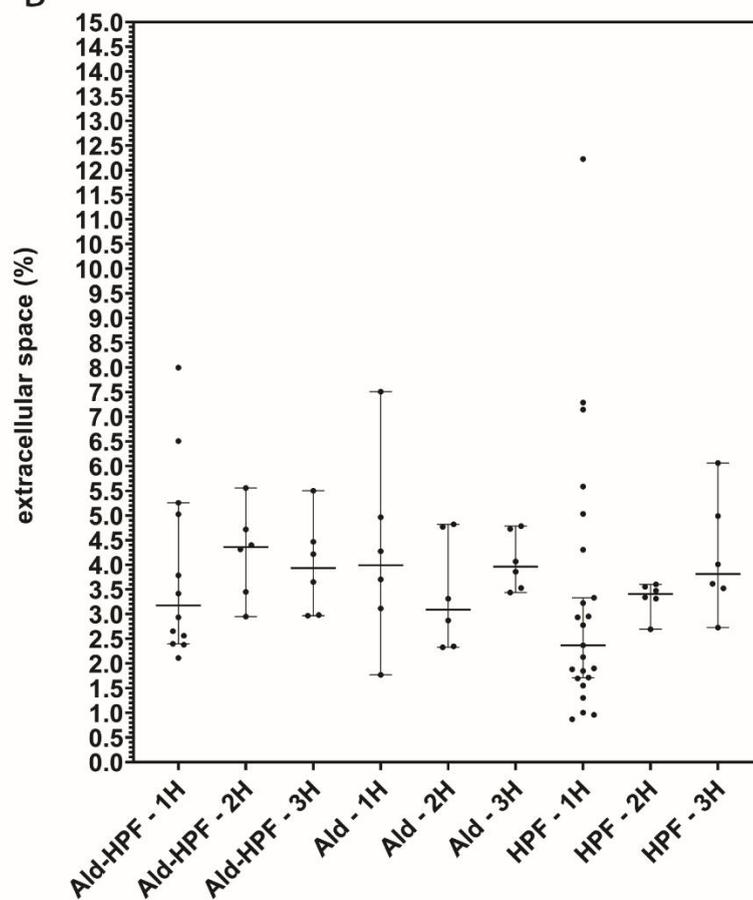


1 HOUR

2 HOURS

3 HOURS

B



## RESULTATS

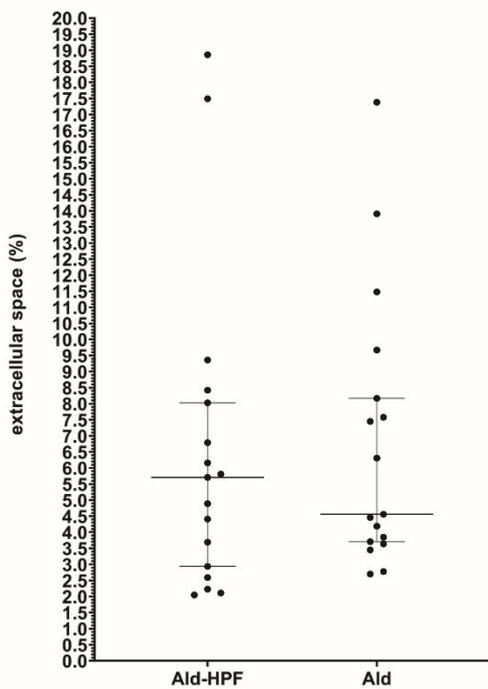
Figure I-5 : Cells preservation was not optimal across time with aldehyde protocol but looked more stable with aldehyde-HPF and HPF protocols. (A) Representative images of semi-thin sections displaying the granular cell layer of the dentate gyrus at 1 hour, 2 hours and 3 hours upon aldehyde fixation treatment. An increasing number of cells swelling were observed across time and cellular death appear after 2 hours immersed in ACSF. (B) Graph showing the average percentage of extracellular space upon each treatment and across time resting in ACSF. Analysis showed that no modification of the extracellular space is observed upon each treatment and across time in the hippocampal neuropile

### Impact of two-photon imaging on the preservation of the brain slices:

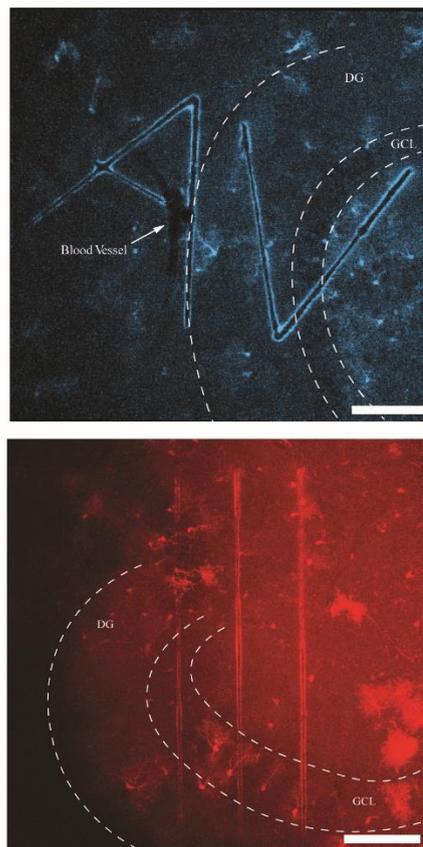
We finally wanted to evaluate the impact of two-photon imaging on astrocyte morphology. Our concern was that placing slices in the imaging chamber could cause some damage due to hypoxia and two-photon imaging could induce phototoxicity due to the release of free radical ions (Laissue et al. 2017). Therefore, horizontal section of the brain was prepared and hemi-slices were placed into oxygenated ACSF at 34°C for 45 minutes before being inserted into the imaging chamber under the microscope with the beam light turn on for 20 minutes. The slices were then fixed in cold 1.6% Glutaraldehyde, the hippocampus was punched and embedded in epoxy resin according to the aldehyde-HPF protocol. Images were then processed as described above to evaluate the percentage of extracellular space in the hippocampal neuropile and so far, no modification of the extracellular space in the neuropile nor specific damages in the slices could be observed (statistics, figure 5, A).

Finally, since near infrared branding have been reported as a universal and conservative approach for correlative light electron microscopy applied to biological tissue (Bishop et al. 2011), we wanted to check the impact of this method on astrocyte morphology. Hippocampal slices have been prepared for calcium imaging experiment and successive 2D images have been acquired by two-photon microscopy. The slices were then fixed by glutaraldehyde 1.6% and a V shaped fiducial were traced to define a region of interest into the sample by using the 2-photon beam 40  $\mu\text{m}$  under the surface of the slice. The slices were then punching around the hippocampus and processed for aldehyde-HPF before being embedded. By collecting serial semi-thin sections, we succeeded in finding the level of the branding and to acquire ultrathin sections (Figure 6). Electron microscopy analysis of the section confirms that cellular damages are restricted to the branding area (Figure 6, C)

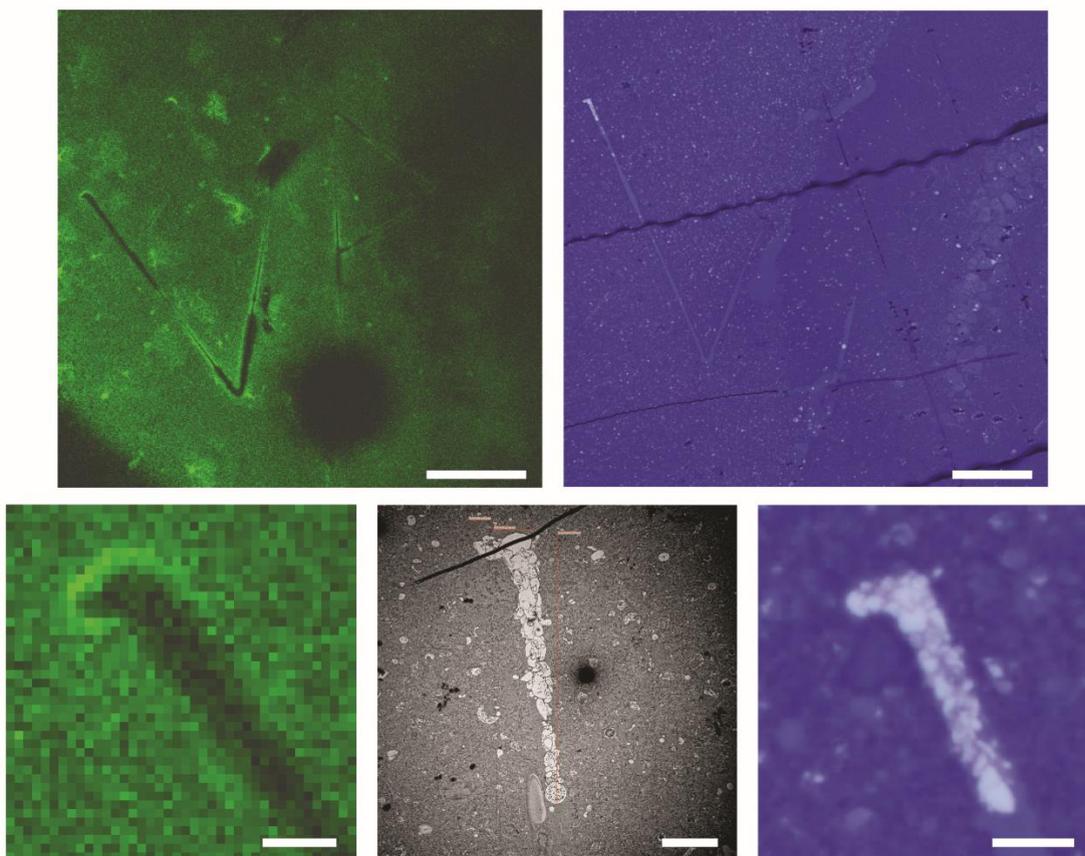
A



B



C



## RESULTATS

Figure I-6 : Correlative light electron microscopy could be achieved by using aldehyde-HPF fixation protocol. (A) Graph displaying the average extracellular space in slices observed after 45 minutes resting in ACSF followed by 20 minutes under the two-photon microscope and then processed for HPF, Aldehyde-HPF or aldehyde fixation protocol. No difference in the percentage of the extracellular space was observed. (B) Representative images of branding tests on hippocampal slices. (C) Typical correlative recollection of fiducials using two photons, optical and electron microscopy. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$  in (B) and (C) top images and 10  $\mu\text{m}$  in (C) bottom images.

### Discussion:

In this study, the aim was to evaluate the impact of electron microscopy sample preparation on the morphology of the astrocytes. For this purpose, the overall preservation of the neuropile was assessed after using three paradigms of fixation: (i) immersion in aldehyde, (ii) immersion in aldehyde followed by high-pressure freezing and (iii) high pressure freezing alone. All samples were embedded in epoxy resin after a cryo-substitution step except those from the first condition that was embedded in epoxy resin at room temperature according to the conventional epoxy protocol. These protocols were tested on acute hippocampal slices either directly after the vibratome slicing or after 1, 2 or 3 hours of incubation in artificial cerebrospinal fluid.

We describe here that the main morphological alteration of the tissue is the formation of an astrocytic oedema around the capillaries. Already right after the slicing, all samples displayed the same phenotype, which thus no depend on the fixation process, but rather on the preparation of the slices. However, differences of the quality of the ultrastructural preservation of the astrocytic endfeet were obvious when the 3 conditions were compared, since the cytoplasmic content of aldehyde fixed astrocytes was most of the time extracted during the preparation, a phenotype that was not observed when high-pressure freezing and cryo-substitutions were applied subsequently. It turns out that the classical conventional epoxy embedding process and more specifically the ice ethanol dehydration step are involved in the formation of artefacts such as curvilinear and irregular shape of the membranes as well as the loss of cytoplasmic components especially in astrocytes (extraction).

Interestingly, the used of aldehyde fixation before cryo immobilisation by high pressure freezing did not alter the morphology of the samples if compared with the HPF condition alone. In the past, aldehyde fixative has been suspected to promote the formation of artefacts and to induce the shrinkage of the tissue, we thus decided to

quantify the percentage of extracellular space in these samples. Since we did not observe any difference between the three conditions, we thus propose that the tissue retraction observed in this previous study could be challenged. In fact, most of the studies that revealed shrinkage of the sample are done with fixative buffer that is hyperosmolar if compared to the tissue (Korogod, Petersen, et Knott 2015; Schultz, Maynard, et Pease 1957; Takahiro Takano et al. 2014). Indeed, it is common in the EM field to use high concentration of paraformaldehyde (4%) with 2.5% glutaraldehyde to rapidly fix the tissue, but such concentration could promote water flow and shrinkage of the tissues due to the high osmolarity. For our study, we took care to use only 1.6 % glutaraldehyde in 0,1 M phosphate buffer to have a fixation buffer which is iso-osmolar with the tissues.

Another feature that could account for the modification of extracellular space observed in the above-mentioned study is that aldehyde perfused fixed brain samples were compared with HPF frozen acute slices. Having an increase of the extracellular space in HPF prepared samples does not necessarily imply that aldehyde reduce this extracellular space, one could also think that acute slices tend to be less compact since there is no skull to prevent the stretching of the tissue. Moreover, the slicing process by itself may promote some modification of the astrocyte as described above. From our personal experience, the amount of extracellular space did vary across the slices of the same condition and even in the same slices there are areas in the borders where the tissue is more compact than in the centre of the slice. Finally, preparation of acute slice is a matter of experience, slices prepared by highly trained postdoc students have less extracellular space than those prepared by a PhD student (data not shown).

A second concern was the degree of preservation of the astrocyte in acute slices after incubation time in ACSF as requested for Ca<sup>2+</sup> imaging experiments. It has been shown previously that an increase of extracellular space occurred in acute slices across time, authors even provided evidence of astrogliosis processes during this time (Takahiro Takano et al. 2014). Here, we do not observe such variation of extracellular space across time but cellular damages were obvious after 2 hours of incubation: the main feature was the swelling of cellular components including astrocytic processes. Interestingly, these damages were exacerbated in the aldehyde-conventional preparation protocol and appeared earlier in these samples. This may be due to the fact

## RESULTATS

that swollen astrocyte is difficult to fix with aldehydes only and thus loss of intracellular material is unavoidable and more visible.

Finally, we also addressed the issue of the potential damages caused by two-photon experiment due to the production of radical ions, but we did not observe any difference in the tissue preservation; similarly, the use of “near infrared branding” to create fiducial inside the tissue (Bishop et al. 2011; Lees et al. 2017) did not seem to be deleterious to the adjacent tissue. We thus suggest that CLEM experiments could be carried on between 45 minutes to 2 hours after slice recollections and these samples could be prepared with the aldehyde-HPF protocol.

Altogether these results suggest that a prefixation step with 1.6% glutaraldehyde before HPF does not affect the ultrastructural preservation of the hippocampal neuropile and even prevent, at least partially, the formation of ice crystal during the high-pressure freezing process (A-HPF). Hence, this protocol is designed to study the ultrastructural morphology of the astrocyte but, more globally, the use of glutaraldehyde fixation before HPF cryo-immobilisation seems to be in adequacy with an optimal preservation of the neuropile and should thus be envisioned for EM brain studies.

## References

Arizono, Misa et al. 2021. « Super-Resolution Shadow Imaging Reveals Local Remodeling of Astrocytic Microstructures and Brain Extracellular Space after Osmotic Challenge ». *Glia* 69(6): 1605-13.

Bindocci, Erika et al. 2017. « Three-Dimensional Ca<sup>2+</sup> Imaging Advances Understanding of Astrocyte Biology ». *Science* 356(6339): eaai8185.

Bishop, Derron et al. 2011. « Near-Infrared Branding Efficiently Correlates Light and Electron Microscopy ». *Nature Methods* 8(7): 568-70.

Bouzat, Pierre et al. 2013. « Changes in Brain Tissue Oxygenation after Treatment of Diffuse Traumatic Brain Injury by Erythropoietin ». *Critical Care Medicine* 41(5): 1316-24.

Castejón, O. J. 1998. « Morphological Astrocytic Changes in Complicated Human Brain Trauma. A Light and Electron Microscopic Study ». *Brain Injury* 12(5): 409-27; discussion 407.

Korogod, Natalya, Carl CH Petersen, et Graham W Knott. 2015. « Ultrastructural Analysis of Adult Mouse Neocortex Comparing Aldehyde Perfusion with Cryo Fixation ». *eLife* 4. <https://elifesciences.org/articles/05793> (17 décembre 2018).

Laissue, P. Philippe et al. 2017. « Assessing Phototoxicity in Live Fluorescence Imaging ». *Nature Methods* 14(7): 657-61.

Lees, Robert M. et al. 2017. « Correlative Two-Photon and Serial Block Face Scanning Electron Microscopy in Neuronal Tissue Using 3D near-Infrared Branding Maps ». *Methods in Cell Biology* 140: 245-76.

Marina, Nephtali et al. 2018. « Brain Metabolic Sensing and Metabolic Signaling at the Level of an Astrocyte ». *Glia* 66(6): 1185-99.

Möbius, Wiebke et al. 2010. « Electron Microscopy of the Mouse Central Nervous System ». *Methods in Cell Biology* 96: 475-512.

Peters, Alan, Sanford L. Palay, et Henry deF Webster. 1991. *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells*. 3rd ed. New York: Oxford University Press.

Rose, C. R., et A. Konnerth. 2001. « Stores Not Just for Storage. Intracellular Calcium Release and Synaptic Plasticity ». *Neuron* 31(4): 519-22.

Santello, Mirko, Nicolas Toni, et Andréa Volterra. 2019. « Astrocyte Function from Information Processing to Cognition and Cognitive Impairment ». *Nature Neuroscience* 22(2): 154-66. <http://www.nature.com/articles/s41593-018-0325-8> (29 novembre 2020).

Schultz, R. L., E. A. Maynard, et D. C. Pease. 1957. « Electron Microscopy of Neurons and Neuroglia of Cerebral Cortex and Corpus Callosum ». *The American Journal of Anatomy* 100(3): 369-407.

Takano, Takahiro et al. 2014. « Rapid manifestation of reactive astrogliosis in acute hippocampal brain slices ». *Glia* 62(1): 78-95.



## Chapitre II: Les corrélats ultrastructuraux qui sous-tendent la signalisation calcique de l'astrocyte

Ce deuxième article en préparation correspond à l'étude centrale de mon travail de thèse. Dans ce travail, nous avons exploré en microscopie électronique à faisceaux d'ions focalisés l'ultrastructure 3D des astrocytes du gyrus denté. Pour obtenir une préservation optimale des astrocytes, nous avons utilisé des méthodes cryogéniques pour la préparation des échantillons. Nous avons développé un « workflow » d'analyse dans le but de reconstruire la structure cellulaire et d'obtenir des données morphométriques quantitatives nous permettant de mieux décrire cette organisation. Nous avons ensuite étudié la signalisation calcique de l'astrocyte sur la base des données morphologiques obtenues en microscopie électronique.

Nos résultats montrent une organisation en domaine des prolongements cytoplasmiques fins de l'astrocyte. Nous avons décrit pour la première fois l'existence de saccule de réticulum endoplasmique et une signalisation calcique dépendante des récepteurs à l'inositol triphosphate dans ces domaines. Nous démontrons la présence de récepteurs à l'IP<sub>3</sub>Rs au niveau de la membrane de ces réticulums. Enfin, nous avons observé que la signalisation calcique répond à l'activité synaptique. Nous proposons donc une nouvelle vision de l'organisation morpho-fonctionnelle des interactions synapses/astrocytes en réseau tripartite s'opposant à la conception usuelle de synapse tripartite.

Dans cette étude, j'ai réalisé l'intégralité des préparations des échantillons pour la microscopie électronique, la mise en place du « workflow » d'analyse d'image, la reconstruction des cellules et l'obtention de mesures morphométriques. Une partie du protocole d'analyse d'image fut développée en collaboration avec Arnold Fertin de l'équipe TIMC. Les acquisitions en microscopie électronique à faisceau d'ions focalisés furent réalisées par Pierre Henri Jouneau. L'imagerie calcique, les études transcriptomes et les expériences d'électrophysiologies furent réalisées respectivement par : Ines Hristovska, Roberta De Ceglia et David Littevin de l'équipe du laboratoire d'Andréa Volterra.

## RESULTATS

Cet article est présenté comme un résumé conceptuel préliminaire à la publication. Les résultats obtenus au sein du laboratoire d'Andréa Volterra sont présentés en tant que résultats préliminaires, les analyses étant encore en cours.

### 3D Ca<sup>2+</sup> Ultrastructural Correlates of the Astrocyte Leaflets

Lucas Benoit<sup>1,#</sup>, Inès Hristovska<sup>2,#</sup>, David Littevin<sup>2</sup>, Erika Bindocci<sup>2</sup>; Roberta De Ceglia<sup>2</sup>, Carlos Vivar-Rios<sup>2</sup>, Arnold Fertin<sup>3</sup>, Pierre-Henri Jouneau<sup>4</sup>, Nicolas Liaudet<sup>2</sup>, Yves Usson<sup>3</sup>, Karin Pernet Gallay<sup>1</sup> and Andréa Volterra<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut neurosciences, INSERM U1216

<sup>2</sup> Université de Lausanne, Département neurosciences fondamentales

<sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000, Grenoble, France.

<sup>4</sup> CEA Grenoble, DRFMC/SP2M, Laboratoire d'Études des Matériaux par Microscopie avancée, 15 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

# Contributed equally to this work

#### Introduction:

Astrocytes are cells that are not electrically excitable, but the evolution of optical microscopy techniques and the development of high temporal resolution calcium probes have made it possible to demonstrate that there is a 'language' within astrocytes that relies on variations in the intracellular concentration of calcium ions. It is now known that 80-90% of this Ca<sup>++</sup> signaling takes place in microdomains located in the thinnest cytoplasmic extensions of the astrocyte and that part of this signaling is correlated with neuronal activity (Bindocci et al. 2017).

The origin of these calcium signals is still poorly understood, and at present there are no obvious structural features. According to the vast literature on Ca<sup>2+</sup> dynamics in astrocytes, a preponderant role in these cells is exerted by GPCR-evoked activation of the IP<sub>3</sub>R2 isoform, present on the ER membranes (Agulhon et al. 2008). However, use of IP<sub>3</sub>R2KO mice has shown that, despite the fact that in these mice the most visible Ca<sup>2+</sup> events occupying the entire soma and main processes are abolished, more subtle and largely local activity is retained, mainly at the periphery of the astrocyte arbour (Castro et al. 2011 ; Okubo et al. 2019 ; Petravicz, Fiacco, et McCarthy 2008 ; Takata et al. 2013). In this respect, genetic and pharmacological data suggested roles also for the other two IP<sub>3</sub> receptor isoforms, IP<sub>3</sub>R1 and IP<sub>3</sub>R3 (Sherwood et al. 2021) as well as for

## RESULTATS

other Ca<sup>2+</sup> sources, such as channels and pumps inducing entry of extracellular Ca<sup>2+</sup> in the astrocyte (Ahmadpour, Kantroo, et Stobart 2021).

Intriguingly, evidence exists for complex mitochondrial and ER morphologies in astrocytes *in situ*, where these organelles have been found to reach processes far from the cell body and end-feet processes (Göbel, Motori, et Bergami 2018; Jackson et Robinson 2015; Lovatt et al. 2007; Mathiisen et al. 2010; Motori et al. 2013). In astrocyte ER tubules are often found around mitochondria in branches and PAPs. However, a discrepancy about the presence of these organelles in the peripheral astrocyte processes (PAPs) and in other really fine processes (leaflets) remains.

The main difficulty to understand these Ca<sup>2+</sup> oscillations is that these microdomains are smaller than the resolution of light microscopes, so electron microscopy studies are needed to resolve the fine ultrastructure of these structures; moreover, the morphology of the fine extensions of the astrocyte requires three-dimensional approaches to understand their interaction with synaptic elements.

In this study we used high pressure freezing and cryosubstitution to optimally preserved the astrocytes morphology and acquired images using Focus-ion beam scanning electron microscopy. We obtained three astrocytic fragments of the mice dentate gyrus of the hippocampus that we reconstructed with its neighbouring synapses in 3D. Next, we segregated astrocytic leaflets from main processes and analysed the ultrastructure of these peculiar structures of the astrocytes. We observed that leaflets were organised in specific domains. We showed that leaflet domains preferentially interact with synapses and we found the first evidence of the presence endoplasmic reticulum saccules inside these processes close to synapses. Thus, supporting the idea of a tripartite network organisation of the leaflet domains of the astrocyte.

### Method:

#### High-pressure freezing and cryo-substitution for FIB/SEM imaging

3 Adult mice (C57 BL/6 J, 6-7 weeks old) were anesthetized with Exagon (1 ml/kg) then perfused transcardially with phosphate buffer (PB; 0.1M) solution of 1.6% Glutaraldehyde. Brains were extracted and soaked in fixative for 2 hours before being

cut in 300 µm thick coronal sections. All experiments were performed in accordance with the recommendations of the European Union (2010/63/UE).

The hippocampus was collected using a circular punch with an inner diameter of 2 mm. Punches were quickly immersed in 20% BSA in PB 0.1M for cryo-protection before high pressure freezing (Leica, HPM100). Frozen samples were transferred in the cryo-substitution chamber (AFS2, Leica Microsystem) and were stained at low temperature (-90°C) with 2% OsO<sub>4</sub> / 0.1% Uranyl acetate prior to resin embedding in epoxy.

Samples were then processed for focus ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) which has been realised in a ZEISS CrossBeam 550. The epoxy embedded samples were iteratively abraded of 4 nm with a Ga<sup>+</sup> ion beam (of 700 nA at 30 kV) and imaged in scanning electron microscopy (SEM) at 1.5 kV using the in-column ESB backscatter detector. SEM images were obtained with a lateral resolution of 4 nm providing an isotropic voxel of 4 nm and a field of view of approximately 20 x 15 µm.

For detailed procedures consult the bio protocol ([Bio-protocol n°1](#)).

### Immunogold pre-embedding

Adult mice (C57 BL/6 J, 6-7 weeks old) were anesthetized with Exagon (1 ml/kg) then perfused transcardially with phosphate buffer (PB; 0.1M) solution of 2.5% Paraformaldehyde / 0.5% Glutaraldehyde. Brains were extracted and soaked in fixative for 2 hours before being cut in 300 µm thick coronal sections then transferred into PB (0.1M) then process for immunogold labelling. All experiments were performed in accordance with the recommendations of the European Union (2010/63/UE).

Hippocampal slices were permeabilized with a solution of 5% Normal Goat Serum (NGS; Abcam, ab7481 / 0.1% Saponin. IP3Rs receptors were labelled with primary antibody Rabbit anti-IP3Rs (MERCK 07-1210) and secondary antibody coupled with 1.6 nm colloidal gold Nanogold®-IgG Goat anti-Rabbit IgG (Nanoprobe, 2003-1ML). Prior to silver enhancements with HQ Silver, Silver enhancement kit (Nanoprobe, 2012-45ML) sample were postfixed overnight in 2% Glutaraldehyde Grade 1 (Sigma, G5882-100 ml). Detailed protocol of the immunogold pre-embedding procedure Immunolabelled has been published as Bio-protocol ([Bio-protocol n°3](#)). Samples were then processed for HPF and cryo-substitution as described previously ([Bio-protocol n°1](#)).

## Image Analysis

During the acquisition of the FIB/SEM stacks, a translation drift was observed, resulting in a shift from a single 2D plane to the next. The sections were registered by correcting these shifts using Phase-Only-Correlation (POC) method implemented as Fiji plugin (Schindelin et al. 2012). The POC method is a standard frequency domain method to relate two shifted signals. In order to estimate the shift between two consecutive planes  $P_1$  and  $P_2$ , we calculate their normalised cross-power spectrum:

$$R(\omega) = \frac{\overline{P_1(\omega)} P_2(\omega)}{|P_1(\omega) P_2(\omega)|}, P_1(\omega) = \mathcal{F}(P_1), P_2(\omega) = \mathcal{F}(P_2) \quad (1)$$

where  $\mathcal{F}$  denotes Fourier transform. The inverse Fourier transform of  $R(\omega)$  gives POC function:

$$r(x, y) = \mathcal{F}^{-1}(R(\omega)) \quad (2)$$

The main property of the POC function is to exhibit a unique sharp peak which location corresponds to the displacement from  $P_1$  to  $P_2$ . Thus, the shift due to drift is estimated with:

$$\Delta = \arg \max_{x,y} (r(x, y)) \quad (3)$$

The displacements were estimated across the whole stack from plane to plane, and then each plane was translated by corresponding  $-\Delta$ . As FIB/SEM stacks are very large datasets (up to 110 Go), they were processed with two steps to make them tractable and provide fast image processing. First, a voxel size reduction from 4x4x4 nm to 8x8x8 nm was performed with an average binning. This other the advantage to also perform a noise filtering. Finally, a single stack was split on the x- and y-axis by 2 and by 350 along the z-axis. These allow fastening the segmentation process as each sub-volume was segmented independently.

The FIB/SEM datasets contain five main groups of biological objects of interest, these are astrocytes, spine, axons, endoplasmic reticulum and mitochondria. The

segmentation process consisting in identifying and labelling these objects. The segmentation was performed with the semi-automated carving workflow from "Ilastik" software (Straehle et al. 2011). This workflow starts by computing a boundary map and then by aggregating voxels into supervoxels on the basis of their intensity and proximity (Achanta et al. 2012). A watershed algorithm connects supervoxels together starting from markers provided by the user. Finally, the segmented and labelled sub-volumes were stitched to reconstruct the original volume.

The segmentation masks were exported as NumPy arrays to be manipulated with python. In these arrays each individual object was labelled by a single grey value. Each array was concatenated to reconstruct the full volume and labels of similar objects present in two adjacent stacks were homogenised. Segmentation masks were then saved as ".tif" for further quantitative analysis in Fiji.

Volume and surface were measured with the ImageJ 3D suite for each object. Astrocytes were analysed by splitting them into two categories: (1) MP (processes with a diameter > 200 nm and (2) leaflets (processes with a diameter < 200 nm). These subdomains were obtained by using mathematical morphology operators with MorpholibJ (Legland, Arganda-Carreras, et Andrey 2016). Interaction analysis between two biological objects were obtained with homemade Fiji plugins available at: [https://github.com/a-r-n-o-l-d/Euclidean\\_Distance\\_Transform\\_MT](https://github.com/a-r-n-o-l-d/Euclidean_Distance_Transform_MT); [https://github.com/a-r-n-o-l-d/Phase\\_Only\\_Correlation](https://github.com/a-r-n-o-l-d/Phase_Only_Correlation); <https://github.com/a-r-n-o-l-d/NeuroMacros>.

Detail image analysis procedure was available in the following Bio-protocol ([Bio-Protocol 2](#)).

## Statistical analysis

All results are expressed in mean +/- SEM. Statistics were realised using the Graphpad Prism 8.4.3 software. Nested-ANOVA was realised to take into account the inter-individual variability when normality of the distribution and homogeneity of variance were assumed. Tukey's test was used as a post-hoc test for multiple comparison. The Pearson correlation coefficient was used to assess for correlation.

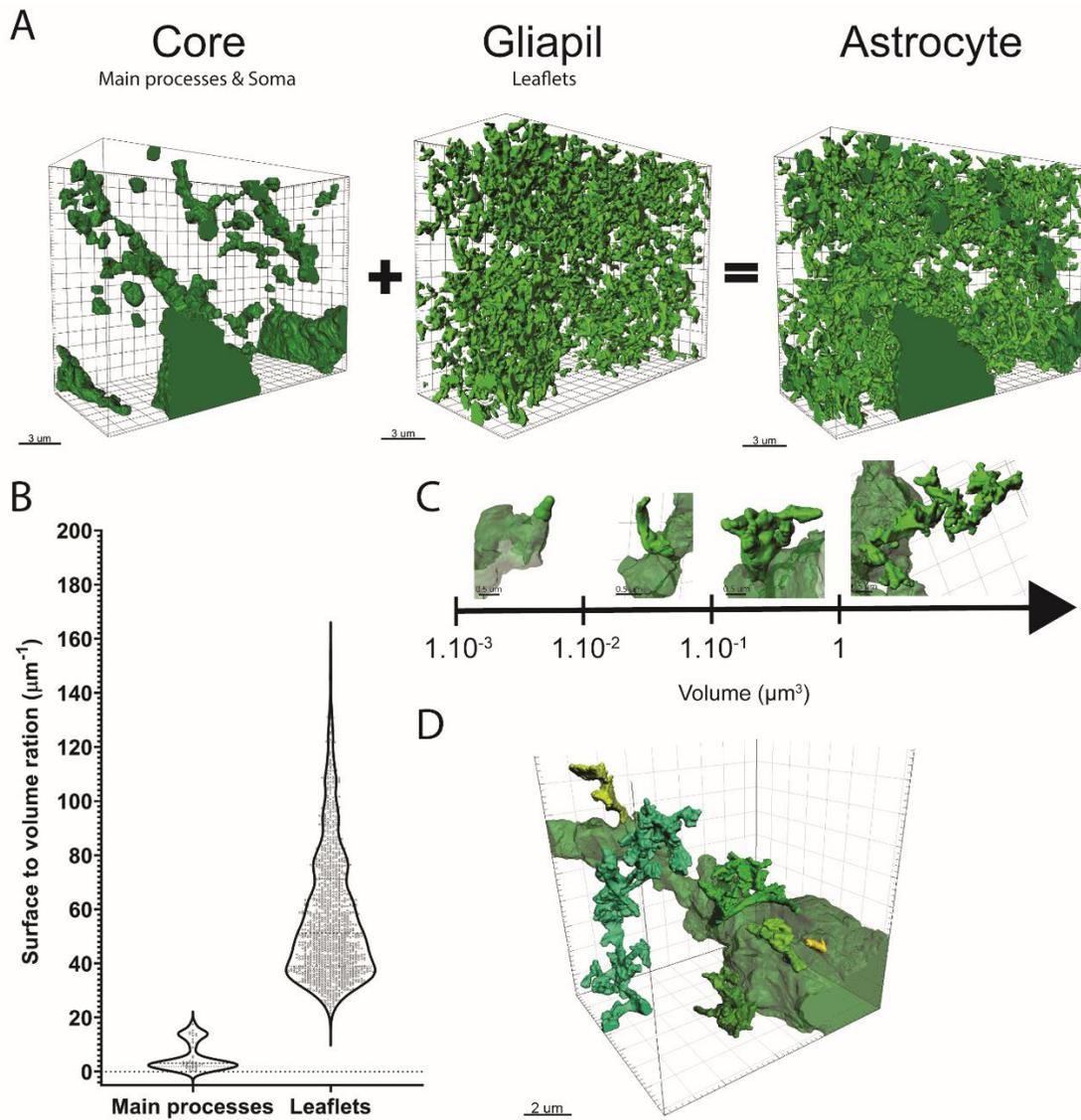
## Results:

To optimally preserve the morphology, mice were fixed by aldehyde perfusion and the brain was sliced in sections of 300 $\mu\text{m}$ . The slices were frozen by HPF before being stained and embedded in epoxy resin by cryosubstitution. The polymerized sample was first imaged by 2D TEM to identify the position of the granule cells, and then imaged by FIB/SEM microscopy. Three image stacks have been acquired in the molecular layer of the dentate gyrus for a volume of respectively (800; 2532 and 464  $\mu\text{m}^3$ ) with a voxel size of 4 nm. In each stack, astrocytes membrane could be identified, there is however only a fraction of one or two astrocytes in each stack; in the first and second stack, part of the astrocyte cell body has been imaged, whereas the third stack includes more distal components of the cell. The astrocyte as well as the ER and the mitochondria were segmented by using a watershed algorithm so that 3D measurements could be obtained. The fraction of the imaged volume occupied by the astrocyte was respectively (18.1, 10.9 and 7.42 %).

Synapses were abundant in the three stacks; they could be easily identified thanks to the high contrast of the post synaptic density. A few inhibitory synapses located on dendritic shaft were observed in each stack (< 10%), but we focused our analysis on glutamatergic synapses that contact dendritic spines. To better understand how the astrocyte interacts with these synapses, all dendritic spines as well as their corresponding axonal button have been segmented in subparts of each stack. More precisely, in each stack respectively 276, 284 and 318 synapses have been segmented and the mean spine density in the three stacks is ( $1,17 \pm 0,1$  synapses/ $\mu\text{m}^3$ ).

The volume of the spines ranges from ( $0,003 \pm 0,001 \mu\text{m}^3$ ) to ( $0,5 \pm 0,06 \mu\text{m}^3$ ). The five conventional population of spines, namely, filopodia, thin, stubby branched and mushroom have been observed in each stack as previously described (Harris 1992). Such morphology is related to the function of the spine, since it is modulated, among other, by the highly dynamics reorganization of actin cytoskeleton that occurs upon synaptic activity (Star et al. 2002). Such reorganization affects not only the morphology of the spine but also the size of the post synaptic density in a correlative manner. As a result, the synaptic strength, i.e., the intensity of the response to a stimulus, is directly proportional to the spine size (Okamoto et al., NN, 2004; Hotulainen and Hoogenraad, JCB, 2010). We therefore divided our spine population in two sub populations depending on their volume. One subpopulation of small spine which volume is (<

0,025  $\mu\text{m}^3$ ) and a population of large spine large ( $> 0,025 \mu\text{m}^3$ ). The large spine sub population represents (44,64 %  $\pm$  5,09) of the total spine population, they have a significantly lower sphericity ( $0,45 \pm 0,019$ ) if compared to the small spines ( $0,5 \pm 0,02$ ) and their S/V ratio is higher, indicating a higher complexity of these strong synapses ( $p = 0,0133$ ).



## RESULTATS

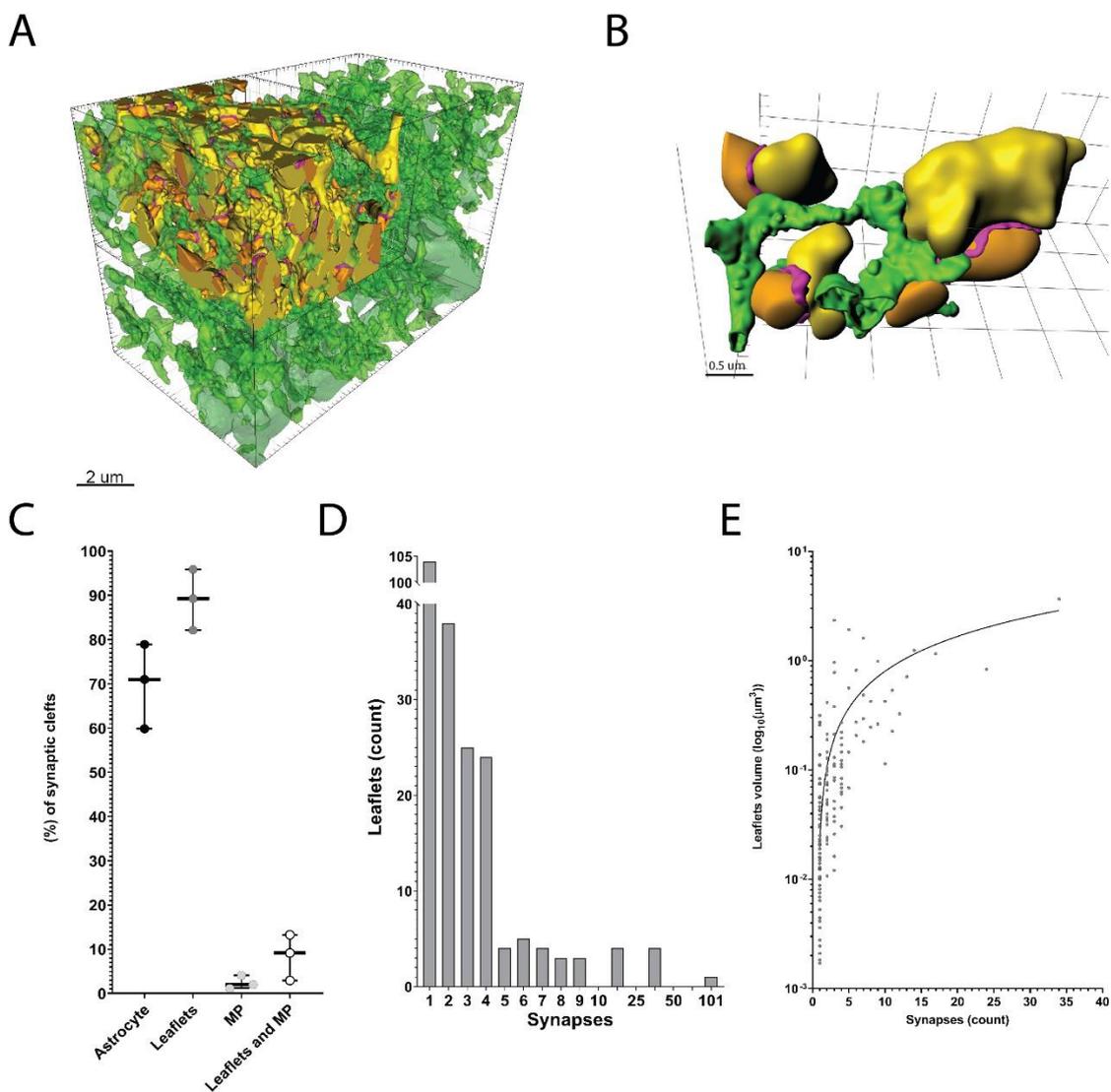
Figure II-1 : The leaflet: a complex subdomain of the astrocyte with a high degree of heterogeneity.

(A) Representative 3D reconstruction of the astrocyte fragment in the 2D stacks of  $20\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m} \times 8,4\ \mu\text{m}$ . (A1) Representative 3D reconstruction of the core of the astrocyte composed of the soma and the main processes (dark green). (A2) Representative 3D reconstruction of the leaflet's subdomains (light green). (A3) Representative 3D reconstruction of the full astrocyte fragment composed of the core and the leaflets subdomains. (B) Violin plot representation of the distribution of the surface to volume ratio of main processes and leaflets in  $\mu\text{m}^{-1}$  (Main processes  $n=74$ ; Leaflets  $n=1267$ ). (C) Representative 3D reconstruction of leaflets in function of their size: from filopodia like structure to very large and complex leaflets. (D) Representative 3D reconstruction of a main process and some of its surrounding leaflets. Each leaflet exhibits different size and volume. Some are very small (yellow) whereas others are a larger and more complex (green). The last leaflets are very large and complex covering a larger portion of the volume (Cyan).

We have discovered that the astrocyte assumes a specific biological organization when it encounters synapses: this organization can involve large volumes enveloping clusters of synapses (around 10 and even more), forming the “spongy”, “gliapil” domain characteristic of the periphery of the astrocyte arbor, or small volumes in which the astrocyte quite abruptly changes its organization and the domain stems out from the soma or a main process to envelope even a single synapse. Therefore, this organization does not seem to depend on the geographical location within the astrocyte, but seems rather to be dictated by the interaction of the astrocyte with synapses wherever this takes place in the astrocyte structure.

The key features that signal the change in biological organization of the astrocyte when it approaches synapses are: (a) reduction in the linear diameter of its structures up to max 200 nm (Figure II-1, A); (b) increase in complexity and convolution of the plasma membrane with significant sudden 5 time increase in the S/V ratio (Figure II-1, B). This organization is appropriate to envelope one or multiple synapses and form the interface domain with them. Leaflets are actually a more diverse population (Figure II-1, C/D). Actually, leaflets exhibit different sizes and shape. Small leaflets are often filopodia like structures emerging from a shaft (Figure II-1, C) when others are connecting component between two MP. Larger leaflets ( $> 10^{-1}\ \mu\text{m}^3$ ) form contact with themselves and between them creating a “fisher net” like structure occupying large volume up to  $285\ \mu\text{m}^3$ , we call this organization the “leaflet domain”. According to the literature, molecular interactions between proteins on the membranes of the two cell types, similar to those linking pre- and post-synapses, shape the astrocyte-synapse interface domain (Takano et al. 2020; Stogsdill et al. 2017).

The astrocyte plasma membrane and the pre- and post-synaptic structures come in close vicinity at many places (Figure II-2; A/B). 70% of dendritic spines have astrocyte membrane within 30 nm distance, i.e., a distance similar, in the perspective of a synaptic or retrograde transmitter, to the one needed to reach the other pole of the neuronal synapse. More precisely, 76% of the large spine and 63% of the small spines are directly interacting with the astrocytic membrane with respectively 26% and 20% of their surface area in direct apposition. Alternatively, or in conjunction, in 70% of the synapses the astrocyte membrane is at a distance inferior to 100 nm to the synaptic cleft and astrocyte are no farther than 500 nm in 93% of the synapses. Most interestingly, 98% of these contacts occur within this “leaflet domain” of the astrocyte that has a peculiar morphological characteristic (Figure II-2, C).



## RESULTATS

Figure II-2 : A leaflets can interact with several synapses. (A) Representative 3D reconstruction of the astrocyte fragment (volume:  $800 \mu\text{m}^3$ ). In a sub volume of the stack ( $200 \mu\text{m}^3$ ) of the stack, all the synapses were segmented ( $n=276$ ). (B) Representative 3D reconstruction of a single leaflet contacting three synapses at the same time. Leaflet (transparent light green), axonal button (yellow), spines (orange) and synaptic clefts (magenta). (C) Whisker box plot of the percentage of contact of the synaptic clefts with the astrocyte and its domains across the three stacks reconstructed (threshold distance = 100 nm). The graph shows that the synaptic cleft is preferentially in the proximity of the leaflet domain if compared with the main processes (MP). (D) Plot of the distribution of the number of leaflets in function of the number of synaptic clefts in proximity of the leaflet (threshold distance = 100 nm). (E) Plot of the number of synapses in function of the leaflets volume in  $\log_{10}(\mu\text{m}^3)$ . The graph displays a linear regression of these measures. The number of synapses in the close vicinity of each leaflet is correlate with the volume of the leaflet (Two tailed Pearson correlation analysis,  $p\text{-value} < 0.0001$ )

To note, however, that most of the times this organization of the astrocyte around the synapses does not correspond to the individual “tripartite” synapse as represented so far in EM pictures and conceptualized in functional schemes (Figure II-2, D). Rather it corresponds to a “tripartite network” of astrocyte structures in which several neighboring synapses are embedded. This domain of organization of the astrocyte may involve several linear micrometers in which the astrocyte structure can be in continuity and the signal potentially communicated within the whole domain as increasing volume of leaflets increases the number of synapses contacted (Figure II-2, E).

Therefore, conceptually, this structure appears apt to support a coordinated interaction between the whole connected astrocyte region and a group of synapses rather than a bidirectional exchange between a single synapse and a single perisynaptic astrocytic process as thought until now.

The internal organellar composition of this astrocyte “leaflet domain” has never been studied in detail so far, due to the minimal size of its structures which can be tackled only with a high-resolution 3D EM approach. We have used here HPF and FIB-SEM approaches to obtain information at 4 nm resolution on all axes. HPF has been described as an excellent technic to perform high quality ultrastructural observation of the mouse brain ([Article 1](#); Möbius et al. 2010b).

Interestingly, the minimal size of the leaflet domain excludes (almost completely) the mitochondria: the smallest ones being in the order of  $200 \mu\text{m}$  in diameter, they are seen throughout the astrocyte backbone from the soma up to the fine processes, but

not in this domain (Figure II-3, E). Actually, the last mitochondrial “outpost”, can be considered as the border place, beyond which starts the leaflet domain. Some specific mitochondrial structures are in small leaflets that connect two main processes. These structures are long (up to 2  $\mu\text{m}$ ) with a diameter of 60 nm and are known as nanotunnels and have been described as communication structure of the mitochondria (Vincent et al. 2017). Likewise, large endoplasmic reticulum (ER) structures with tubules and sheets forming mitochondria associated membranes (MAM) domains together with the mitochondria are present throughout the main processes of the astrocyte (Figure II-3, A/B), such ER are also frequently protruding in the “leaflet domain”.

To our surprise, we also detected the presence in this domain of another type of ER, much smaller, possibly formed by minimal fragments of the complex ER, that we call “isolated ER” (Figure II-3, C). The mean volume of these saccules is 100 time smaller ( $0.004 \mu\text{m}^3$ ) if compared to the complex ER described above ( $0.452 \mu\text{m}^3$ ) (Figure II-3, D) and like the cER, these iER have interesting biological features: they are endowed with ribosomes and they directly interact with the plasma membrane of the astrocyte, forming membrane contact sites within a distance of 30 nm. Such features thus confirm the possibility for astrocytes to undergo local translation in their synaptic domains, in line with “tripartite synaptic plasticity” recently reported, and other coordinated astrocyte-synapses functions. The few occurrence of iER structures that are seen to fuse with the plasma membrane could represent an astrocyte modality for local protein insertion and secretion at the plasma membrane, an alternative secretion pathway that could occur in the absence of a proper local Golgi apparatus and its associated vesicular compartment as observed in the cell body (Prudovsky et al. 2008).

Most interestingly, these iER are distributed in the distal volume of the “leaflet domain” as if assuming a role of relay in the cell intracellular organization. The average distance from the synaptic cleft and the first ER compartment located in the astrocytic leaflet contacting the synapse (iER or cER) is  $539 \pm 26.09$  nm (Figure II-2, F); since Gq-GPCRs have been reported to be located on the astrocyte plasma membrane, such a distance would be compatible with the diffusion of a potential second messenger like IP<sub>3</sub> that moves much more freely in the cytosol than calcium (Kasai et Petersen 1994). In addition, the mean interdistance between two ER compartment is around 373 nm, iER could thus potentially form the first astrocyte “communication outposts” in

## RESULTATS

proximity of synapses and the presence of iER in the most distal region of the “leaflet domain” potentially provides a way of propagation of the signals throughout the interconnected structure, possibly by a calcium induced calcium release process. Interestingly, such organization with a small ER-like compartment non-associated with mitochondria, is also observed in neurons: the spine apparatus is also at a distance of around 500 nm from the post synaptic density and has been involved in the calcium induced calcium release process (CICR) that sustains synaptic signaling (Kasai et Petersen 1994).

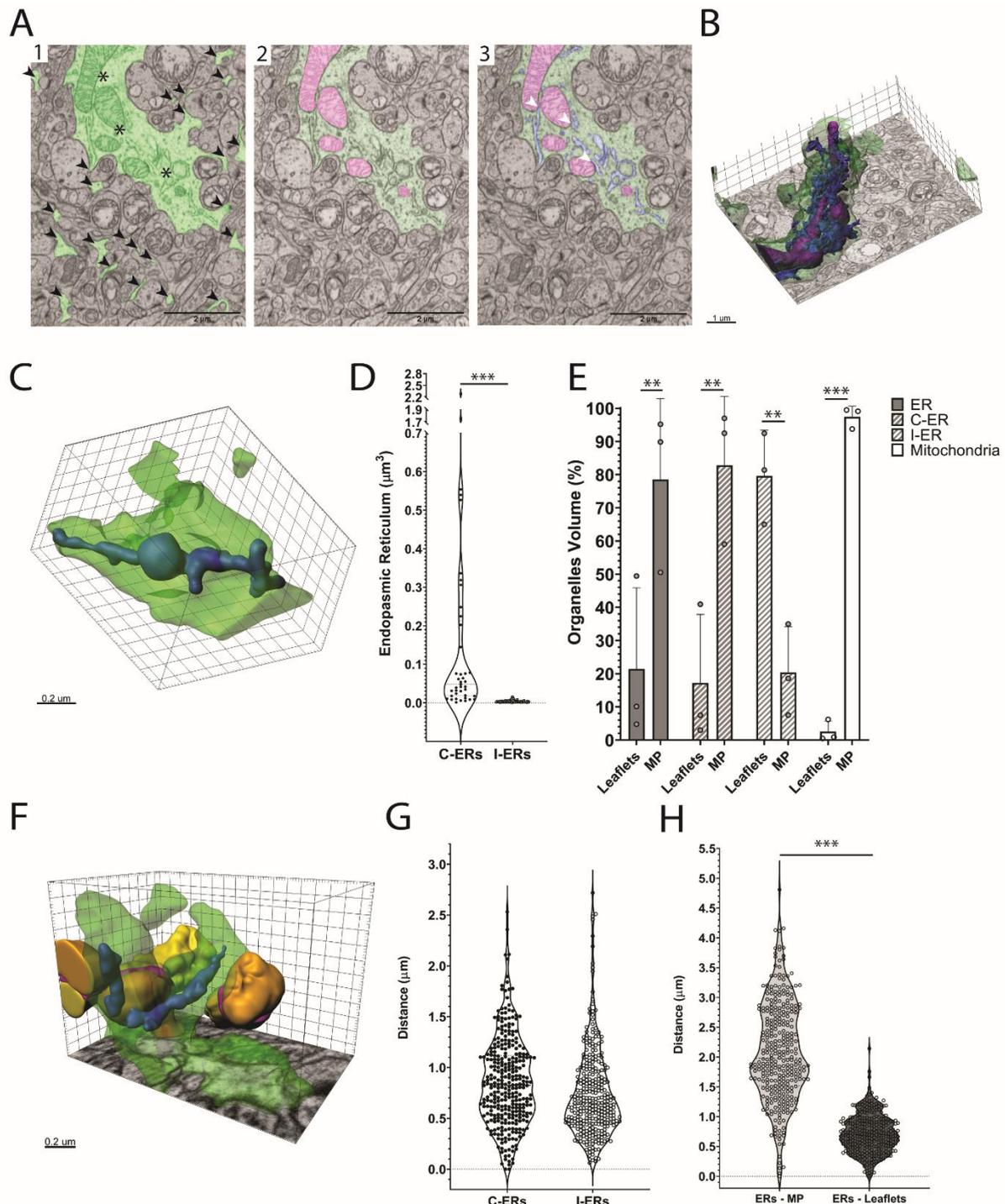


Figure II-3 : Organelles distribution in the astrocytes. (A) Representatives 2D electron micrographs with an overlay of the segmented elements. The left panel shows in a green overlay the astrocyte fragments, with a main process in the centre (star) and leaflets in the periphery (arrowheads). Central panel: in green: main process; magenta: mitochondria. Right panel shows the same elements and in blue the endoplasmic reticulum which surround the mitochondria (C-ER) in the main process. (B) 3D representation of the main process with the mitochondria and the endoplasmic reticulum that are in contact. MP (transparent dark green), mitochondria (purple) and C-ER (dark blue). (C) Representative 3D images of an isolated endoplasmic reticulum cisterna (I-ER) in a leaflet. Leaflet (transparent light green) and I-ER (light blue). (D) Violin plot displaying the distribution of the volume of the C-ER (n = 59) and I-ER (n = 116) population. The two populations differ in average volume (Mann-Witney test, p-value < 0.0001). (E) Separated bar graph displaying the fraction of the volume of the organelle populations in percent inside the two astrocyte subdomains. Each population are represented differentially in the Leaflets versus the main process (two-way ANOVA: Interaction p-value < 0.0001, Domain factor p-value < 0.0001): ER (Sidak's test p-value = 0.0042), C-ER (Sidak's test p-value = 0.0012), I-ER (Sidak's test p-value = 0.003) and mitochondria (Sidak's test p-value < 0.0001). (F) Representative 3D reconstruction of a leaflet (transparent light green) containing an isolated endoplasmic reticulum cisterna (light blue) which contact three synapses: Spines (orange), axonal buttons (yellow) and synaptic clefts (magenta). (G) Violin plot of the distribution of the distance between each synaptic cleft (n = 878) and the closest I-ER or C-ER. No differences are observed between the two populations of ER. (H) Violin plot of the distribution of the distance between each synaptic cleft (n = 878) and the closest endoplasmic reticulum cisternae localised in a main process (light grey) and in leaflets (dark grey). The endoplasmic reticulum cisternae located in leaflets are significantly closer to synaptic clefts than those located in the main processes (Mann-Witney, p-value < 0.0001).

In order to characterize the properties of these iER, we performed an immunogold analysis using a pan-IP<sub>3</sub>R antibody. To unambiguously identify the astrocyte as well as its ER compartment, the samples were imaged in 3D by FIB-SEM after a pre-embedding labelling with the pan-IP<sub>3</sub>R of DG slices, followed by successive steps of silver enhancement, cryo-immobilization and cryo-substitution. By this way, we were able to identify IP<sub>3</sub>R-specific immunoreactivity ([Video n°1 – Positive immunogold labelling in the 3D stack](#)) not just on large ER structures but also on the isolated ER present in mitochondria-free leaflet ([Video n°2 - 3D reconstruction of a leaflet domain with positive immunogold labelling for IP<sub>3</sub>R](#)s) domains that are in proximity of the synapses. These data provide the basal molecular evidence supporting an active role of isolated ER in astrocyte Ca<sup>2+</sup> dynamics in mitochondria-free domains astrocytes domain contiguous to one or multiple synapses.

## RESULTATS

We then checked whether these iER could be involved in the communication between synapses and astrocytes. For this, the leaflets were divided in two populations depending on the presence of an ER compartment, the number of synapses associated to each leaflet was quantified and we observed that  $46,3 \pm 6,7$  % of the synaptic cleft are close ( $< 100$  nm) to leaflets that contain ER, 23,7% are in contact with leaflets devoid of ER whereas (30 %) had no contact at all with the astrocyte. Interestingly, the mean number of synapses contacting each leaflet is proportional to the size of the leaflet: large leaflet contacts many synapses and do contain iER whether very small leaflets contact few synapses, have no ER, but are close to shaft compartment that do contain ER.

In summary, most of the synapses are in contact with large leaflets that all contain ER, either cER or iER. In these leaflets, the distance between the cleft contact site and the ER is around ( $697 \pm 71$  nm), a distance independent of the size of the spine; as expected, this value is significantly lower than the distance between the cleft and the ER locate in the main processes ( $1,76 \pm 0.18$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ; Figure II-3, H).

## Discussion:

In view of the synaptic-like distance of the astrocyte membrane at mitochondria-free leaflet domains and the presence in this domain of organelles (iER) apt at generating and spatially propagate signals via IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> elevations it is possible that synaptic activity could induce the calcium signal observed in the gliapil domain (Bindocci et al., 2017). The dependency of astrocyte Ca<sup>2+</sup> dynamics from neuronal activity (the capacity of astrocytes to listen to synapses and generate functional responses) has been a matter of controversies. While it is clear that astrocytes respond with large whole-cell or multicellular Ca<sup>2+</sup> elevations to strong patterns of neuronal activation such as motor or sensory stimulations *in vivo*, the trigger of the local activity in microdomains at the periphery of the astrocyte, which is also visible *in vivo* in the awake animal (Bindocci et al, 2017), has been less clear, with some studies reporting local Ca<sup>2+</sup> elevations in response to minimal axonal stimulations (Panatier et al. 2011; Bindocci et al. 2017), whereas others indicating the need of bursts of action potentials to generate visible Ca<sup>2+</sup> elevations (e.g Hausteine et al. 2014).

Studies that addressed pharmacologically the source of Ca<sup>2+</sup> events in local microdomains alternatively found (Bindocci et al., 2017) or not found (Agarwal et al. 2017) a TTX-dependent component, as well as a Bafilomycin A1-dependent component, the latter proposed to depend on spontaneous synaptic events (Castro et al. 2011). The only study that indicated a precise cell biological origin for the microdomain Ca<sup>2+</sup> elevations, Agarwal et al (2017), implicated the mitochondria and attributed the Ca<sup>2+</sup> elevations to intrinsic activity in astrocytes rather than synaptic input. However, that study did not have the spatial resolution to explore the Ca<sup>2+</sup> activity in mitochondria-free domains that are closer to synapses. We thus have to address this point by testing the effect of the inhibitory cocktail on Ca<sup>2+</sup> dynamics in astrocyte mitochondria-free domains surrounding synapses. Moreover, in order to obtain direct functional evidence that Ca<sup>2+</sup> dynamics in mitochondria-free astrocyte domains are supported by IP<sub>3</sub>Rs present on isolated ER we will use a new genetic mouse model, in which floxed sequences flank the coding regions of each of the three IP<sub>3</sub>R1, IP<sub>3</sub>R2 and IP<sub>3</sub>R3 genes (IP<sub>3</sub>R1-2-3flox), therefore potentially leading to pan-IP<sub>3</sub>RKO upon Cre recombination.

Overall, our study provides a new understanding of the organization of the astrocyte ultrastructure and show unprecedented evidences supporting the concept of a tripartite

## RESULTATS

network formed by the astrocytic leaflet domains and synapses. These domains are competent for IP<sub>3</sub>Rs calcium signaling that can be triggered by protein G coupled receptor involved in astrocyte/synapses communication. Thus, functional data obtain with calcium imaging in IP<sub>3</sub>Rs-KO astrocytes will allow us to confirmed and described precisely the calcium dynamic in responses to IP<sub>3</sub>Rs signaling and synaptic activity in these domains devoid of mitochondria and at the interface between the astrocyte and the synapses.

## References

Achanta, Radhakrishna, Appu Shaji, Kevin Smith, Aurelien Lucchi, Pascal Fua, et Sabine Süsstrunk. 2012. « SLIC Superpixels Compared to State-of-the-Art Superpixel Methods ». *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 34 (11): 2274-82. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2012.120>.

Agarwal, Amit, Pei-Hsun Wu, Ethan G. Hughes, Masahiro Fukaya, Max A. Tischfield, Abraham J. Langseth, Denis Wirtz, et Dwight E. Bergles. 2017. « Transient opening of the mitochondrial permeability transition pore induces microdomain calcium transients in astrocyte processes ». *Neuron* 93 (3): 587-605.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.034>.

Bindocci, Erika, Iaroslav Savtchouk, Nicolas Liaudet, Denise Becker, Giovanni Carriero, et Andréa Volterra. 2017. « Three-Dimensional Ca<sup>2+</sup> Imaging Advances Understanding of Astrocyte Biology ». *Science* 356 (6339): eaai8185. <https://doi.org/10.1126/science.aai8185>.

Castro, Maria Amalia Di, Julien Chuquet, Nicolas Liaudet, Khaleel Bhaukaurally, Mirko Santello, David Bouvier, Pascale Tiret, et Andréa Volterra. 2011. « Local Ca<sup>2+</sup> Detection and Modulation of Synaptic Release by Astrocytes ». *Nature Neuroscience* 14 (10): 1276-84. <https://doi.org/10.1038/nn.2929>.

Haustein, Martin D., Sebastian Kracun, Xiao-Hong Lu, Tiffany Shih, Olan Jackson-Weaver, Xiaoping Tong, Ji Xu, et al. 2014. « Conditions and Constraints for Astrocyte Calcium Signaling in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway ». *Neuron* 82 (2): 413-29. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.041>.

Jourdain, Pascal, Linda H Bergersen, Khaleel Bhaukaurally, Paola Bezzi, Mirko Santello, Maria Domercq, Carlos Matute, Fiorella Tonello, Vidar Gundersen, et Andréa Volterra. 2007. « Glutamate Exocytosis from Astrocytes Controls Synaptic Strength ». *Nature Neuroscience* 10 (3): 331-39. <https://doi.org/10.1038/nn1849>.

Kasai, H., et O. H. Petersen. 1994. « Spatial Dynamics of Second Messengers: IP<sub>3</sub> and CAMP as Long-Range and Associative Messengers ». *Trends in Neurosciences* 17 (3): 95-101. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90112-0).

## RESULTATS

Legland, David, Ignacio Arganda-Carreras, et Philippe Andrey. 2016. « MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ ». *Bioinformatics* 32 (22): 3532-34. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw413>.

Li, Liyi, Sébastien Sultan, Stefanie Heigele, Charlotte Schmidt-Salzman, Nicolas Toni, et Josef Bischofberger. 2017. « Silent Synapses Generate Sparse and Orthogonal Action Potential Firing in Adult-Born Hippocampal Granule Cells ». *ELife* 6 (août): e23612. <https://doi.org/10.7554/eLife.23612>.

Li, Yan, Floor J. Stam, James B. Aimone, Martyn Goulding, Edward M. Callaway, et Fred H. Gage. 2013. « Molecular Layer Perforant Path-Associated Cells Contribute to Feed-Forward Inhibition in the Adult Dentate Gyrus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (22): 9106-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306912110>.

Lopez-Rojas, Jeffrey, Martin Heine, et Michael R. Kreutz. 2016. « Plasticity of Intrinsic Excitability in Mature Granule Cells of the Dentate Gyrus ». *Scientific Reports* 6 (1): 21615. <https://doi.org/10.1038/srep21615>.

Möbius, Wiebke, Benjamin Cooper, Walter A. Kaufmann, Cordelia Imig, Torben Ruhwedel, Nicolas Snaidero, Aiman S. Saab, et Frédérique Varoqueaux. 2010. « Electron Microscopy of the Mouse Central Nervous System ». *Methods in Cell Biology* 96: 475-512. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96020-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96020-2).

Panatier, Aude, Joanne Vallée, Michael Haber, Keith K. Murai, Jean-Claude Lacaille, et Richard Robitaille. 2011. « Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses ». *Cell* 146 (5): 785-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>.

Prudovsky, Igor, Francesca Tarantini, Matteo Landriscina, David Neivandt, Raffaella Sold, Aleksandr Kirov, Deena Small, Karuppanan Muthusamy Kathir, Dakshinamurthy Rajalingam, et Thallapuranam Krishnaswamy Suresh Kumar. 2008. « Secretion Without Golgi ». *Journal of cellular biochemistry* 103 (5): 1327-43. <https://doi.org/10.1002/jcb.21513>.

Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. « Fiji: An Open-Source

Platform for Biological-Image Analysis ». *Nature Methods* 9 (7): 676-82.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

Stogsdill, Jeff A., Juan Ramirez, Di Liu, Yong Ho Kim, Katherine T. Baldwin, Eray Enustun, Tiffany Ejikeme, Ru-Rong Ji, et Cagla Eroglu. 2017. « Astrocytic Neurologins Control Astrocyte Morphogenesis and Synaptogenesis ». *Nature* 551 (7679): 192-97.  
<https://doi.org/10.1038/nature24638>.

Straehle, C. N., U. Köthe, G. Knott, et F. A. Hamprecht. 2011. « Carving: Scalable Interactive Segmentation of Neural Volume Electron Microscopy Images ». *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention: MICCAI ... International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* 14 (Pt 1): 653-60. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23623-5\\_82](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23623-5_82).

Takano, Tetsuya, John T. Wallace, Katherine T. Baldwin, Alicia Purkey, Akiyoshi Uezu, Jamie L. Courtland, Erik J. Soderblom, et al. 2020. « Chemico-genetic discovery of astrocytic control of inhibition in vivo ». *Nature* 588 (7837): 296-302.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2926>



### Chapitre III: Le Cryo FIB-SEM, un outil prometteur pour la localisation des protéines en 3D (Spehner et al. 2020)

Ce dernier article constitue une étude d'ouverture au sein de mon projet de thèse. En effet, le but de cet article était d'évaluer les possibilités d'utilisation d'un outil d'analyse d'image pour la microscopie électronique cryogénique. Ma participation à cette étude a permis de montrer la possibilité d'application de notre « workflow » d'analyses d'images pour la reconstruction fidèle de cellules obtenues en cryo-EM.

Cette étude fut réalisée au sein de l'IGBMC Strasbourg par Daniele Spehner. La préparation des échantillons et l'imagerie furent réalisées par cette dernière. Les reconstructions basées sur la segmentation manuelle des éléments cellulaires furent produites par Anna M. Steyer. J'ai quant à moi traité les images pour l'utilisation de la segmentation semi-automatique, réalisé cette segmentation et les reconstructions 3D de la cellule.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Structural Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yjsbi](http://www.elsevier.com/locate/yjsbi)

## Cryo-FIB-SEM as a promising tool for localizing proteins in 3D

Daniele Spehner<sup>a,b,c,d,\*</sup>, Anna M. Steyer<sup>e</sup>, Luca Bertinetti<sup>f</sup>, Igor Orlov<sup>a,b,c,d</sup>, Lucas Benoit<sup>g,h,i</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>g,h,i</sup>, Andreas Schertel<sup>j</sup>, Patrick Schultz<sup>a,b,c,d</sup><sup>a</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Department of Integrated Structural Biology, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Illkirch, France<sup>b</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France<sup>c</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258 Illkirch, France<sup>d</sup> Université de Strasbourg, Illkirch, France<sup>e</sup> Electron Microscopy Core Unit, Department of Neurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany<sup>f</sup> Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Department of Biomaterials, 14424 Potsdam, Germany<sup>g</sup> University Grenoble Alpes<sup>h</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1216, Grenoble, France<sup>i</sup> Grenoble Institut Neurosciences, GIN, Grenoble, France<sup>j</sup> Carl Zeiss Microscopy GmbH, Zeiss Customer Center Europe, Carl-Zeiss-Straße 22, D-73447 Oberkochen, Germany

## ARTICLE INFO

## Keywords:

3-D Cryo-FIB-SEM

Immunolabeling

Image processing and machine learning

3D reconstruction and modelling

## ABSTRACT

Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) is an invaluable tool to visualize the 3D architecture of cell constituents and map cell networks. Recently, amorphous ice embedding techniques have been associated with FIB-SEM to ensure that the biological material remains as close as possible to its native state. Here we have vitrified human HeLa cells and directly imaged them by cryo-FIB-SEM with the secondary electron InLens detector at cryogenic temperature and without any staining. Image stacks were aligned and processed by de-noising, removal of ion beam milling artefacts and local charge imbalance. Images were assembled into a 3D volume and the major cell constituents were modelled. The data illustrate the power of the workflow to provide a detailed view of the internal architecture of the fully hydrated, close-to-native, entire HeLa cell.

In addition, we have studied the feasibility of combining cryo-FIB-SEM imaging with live-cell protein detection. We demonstrate that internalized gold particles can be visualized by detecting back scattered primary electrons at low kV while simultaneously acquiring signals from the secondary electron detector to image major cell features. Furthermore, gold-conjugated antibodies directed against RNA polymerase II could be observed in the endo-lysosomal pathway while labelling of the enzyme in the nucleus was not detected, a shortcoming likely due to the inadequacy between the size of the gold particles and the voxel size. With further refinements, this method promises to have a variety of applications where the goal is to localize cellular antigens while visualizing the entire native cell in three dimensions.

## 1. Introduction

Cryo-electron microscopy has become the method of choice for the visualization of cells and their constituents because it preserves biological contents in amorphous ice, close to their native state (Dubochet, 2018). There are only a limited number of strategies available that ensure this state throughout the entire process of sample preparation and visualization. One method, Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections (CEMOVIS) relies on the direct visualization of thin sections (50–70 nm) of a vitrified sample under a cryo-transmission electron microscope (cryo-TEM) produced by diamond knife sectioning under cryogenic conditions. This method has provided remarkable insights into biological structures at a high resolution (Al-Amoudi et al., 2004;

Chlanda and Sachse, 2014). However, the challenges in CEMOVIS are (1) the difficulty to produce high quality ultrathin cryo-sections devoid of cutting artefacts, (2) the small section size and thickness available for observation and (3) the poor contrast of these sections.

The development of FIB-SEM allows the milling of samples at low temperatures and the production of ultrathin lamellas that can be transferred to a cryo-TEM for high resolution cryo-tomography (Marko et al., 2007; Rigort and Plitzko, 2015). Combining this technique with selection of regions of interest by scanning electron microscopy is now an alternative to CEMOVIS. However, Cryo-FIB-SEM is also valuable as a tool for image stack acquisition of entire cells by serial milling and imaging of cryo-fixed biological material in the absence of any heavy metal staining and within the current resolution of the SEM ( $\approx 10$

line average with line average count  $N = 15$  was used.

### 1.1. Image processing

The images of the cryo-FIB-SEM stacks were processed to correct for curtaining, drift, local charge imbalance and were denoised as follows.

### 1.2. Curtaining

Typical cryo-FIB-SEM images often exhibit curtaining. This is mostly due to the uneven surface topography resulting from the uncontrolled fracturing of the amorphous ice blocks and from the presence of small contaminating ice crystals picked up from liquid nitrogen during the transfer steps. In addition, the local compositional difference between different cellular organelles and structures can significantly contribute to the appearance of these artefacts. To correct for the vertical stripes occurring in the stacks, we followed the approach described previously (Munch et al., 2009). Briefly, the image was wavelet decomposed up to a level  $N$  so that the vertical striping noise components are condensed in the vertical details coefficient map. This latter was then 2D-Fourier filtered at every level (using a Gaussian of width  $\sigma$  to dump the low frequency vertical coefficients) and the de-striped image was then calculated by applying an inverse wavelet transform using the 2D filtered vertical coefficient maps. For a detailed visualization of the correction steps, as well as for an in-depth description of the performance and limits of the method, we refer to the original paper (Munch et al., 2009). With this approach, the information related to the vertical stripes are condensed only in the vertical details coefficient of the wavelets transform, which do not carry any low frequency information. For this reason, the overall intensity of the image can be better preserved than with a simple Fourier filtering approach. Moreover, this method allows to more effectively control the bandwidth of the stripe information that has to be filtered out. In this work we applied the wavelet decomposition using the *coif* wavelet family with  $N = 8$  and the vertical coefficient map was filtered using  $\sigma = 3$ . The algorithm was implemented using python 3.7 and based on numpy 1.16 for the calculation of the Fourier Transforms and on pyWavelets v 1.0.1 (Lee et al., 2019) for the wavelets decomposition.

### 1.3. Drift

The image drift was corrected for by using the Fourier shift theorem. We calculated the displacement vector of each image to the previous one (taking the first image of the stack as a reference),  $\mathbf{d}_i$ , using the *phaseCorrelate* function of OpenCV (v 2.4.7). Then, the shift of each image with respect to the first one,  $\mathbf{D}_i$ , was calculated as  $\mathbf{D}_i = \sum \mathbf{d}_i$ . The drift correction was applied after removing the curtaining artefacts as the stripes in subsequent images shift horizontally with respect to the image stack. Therefore, especially if the contrast due to the stripes is large with respect to the one of the features of the objects of interest, the horizontal shift correction could be biased by the shift of the stripes.

### 1.4. Local charge imbalance compensation

To correct for local charge imbalance, we performed a morphological reconstruction (erosion) following a previously described procedure (Vincent, 1993), which is implemented in the morphology module of the *scikit-image* collection of algorithms (v 0.16) (van der Walt et al., 2014) according to the algorithm proposed in (Robinson and Whelan, 2004). Briefly, to produce the mask, the original image was initially subjected to an anisotropic Gaussian filtering. An offset (height) value was then added to the mask and the seed (or marker) image was obtained. Afterward, the seed image was eroded until limited by the mask, which allowed to extract the regional maxima. The corrected image was

then obtained by subtracting the regional maxima (domes) from the original image. All the steps to visualize the proposed workflow are presented in the [Supplementary Fig. S1](#). This process was repeated for every image of the stack using the same values for the offset.

### 1.5. Denoising

To improve the signal to noise ratio, the image stacks were denoised using two different approaches. In the first case, we used the DA3D (Data Adaptive Dual Domain Denoising) (Pierazzo and Facciolo, 2017). As guides for DA3D we used the original images denoised using the non-local denoising filters of *skimage.restoration* of the *scikit-image* collection (v. 0.16.0) (van der Walt et al., 2014). As an alternative, we employed an algorithm (*noise2void*) leveraging the state of the art 2D and 3D deep learning techniques for denoising (Krull et al., 2019). In the latter case, we trained a 3D network using as training set of images a small part of the original stack (40 consecutive images of size  $196 \times 196$  pixels) containing representative organelles and structures of the whole cell. We chose a network architecture with a kernel size of 3 and a depth of 2. The input training patches size was chosen to be  $32 \times 64 \times 64$  pixels and 1.6% of the input pixels were manipulated by sampling neighboring pixels according to a Gaussian distribution of sigma of 25 pixels. The network was typically trained for 40 epochs with 36 steps per epoch. The filtering algorithms and related parameters were chosen by visually (qualitatively) optimizing the corrected images to obtain the largest noise removal with the lowest information loss.

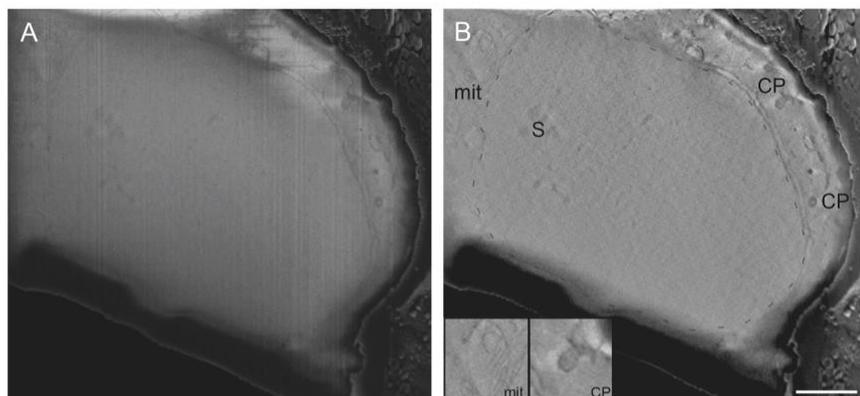
### 1.6. Segmentation

After image processing, IMOD (Kremer et al., 1996) was used to perform a manual segmentation (all organelles were segmented completely, except for the ER where only a portion was segmented). Different drawing tools were used including local thresholding and manual reconstruction. Small spheres were used to represent the nuclear pores. The thresholding tool was applied locally to segment individual speckles throughout the nucleus. In parallel the mitochondria, lipid bodies, lysosomes and the endoplasmic reticulum were segmented semi-automatically using the *carving* tool of the *ilastik* software (Ilastik 1.3.2) (Berg et al., 2019). Since the volume of the image stack is too large to be efficiently processed, the stack was binned in X/Y in order to reduce the noise as well as to reduce the size of the stack. The contrast was then enhanced using the “enhanced contrast” tool from Fiji (set at 50%). Mitochondria, lipid bodies, lysosomes, nucleus and endoplasmic reticulum were segmented by putting a seed in the object. This seed expands until it reaches a limiting membrane which is considered as a barrier. Segmented objects were then exported saved as *.obj* files and imported into Blender, by using “import object” plugin from *Neuromorph* (Jorstad et al., 2018). Quantification of the volume of the objects was expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

## 2. Results

### 2.1. Cryo-FIB-SEM of a HeLa cell on an EM grid

A native HeLa cell grown on a carbon coated EM-grid was examined by cryo-FIB-SEM using the In-Lens detector to collect the low energy secondary electrons (SE) and working at low voltage (below 3 kV). The SE1, secondary electrons, generated at the focal point, have low energy (less than 50 eV) and are sensitive to local surface potential thereby creating variable contrast depending on the nature of the biological material (Schertel et al., 2013). In the case of the HeLa cell examined here (voxel size  $6.5 \times 6.5 \times 30$  nm), the nucleus protrudes from the cell flattened on the EM-grid resulting in images generated after milling

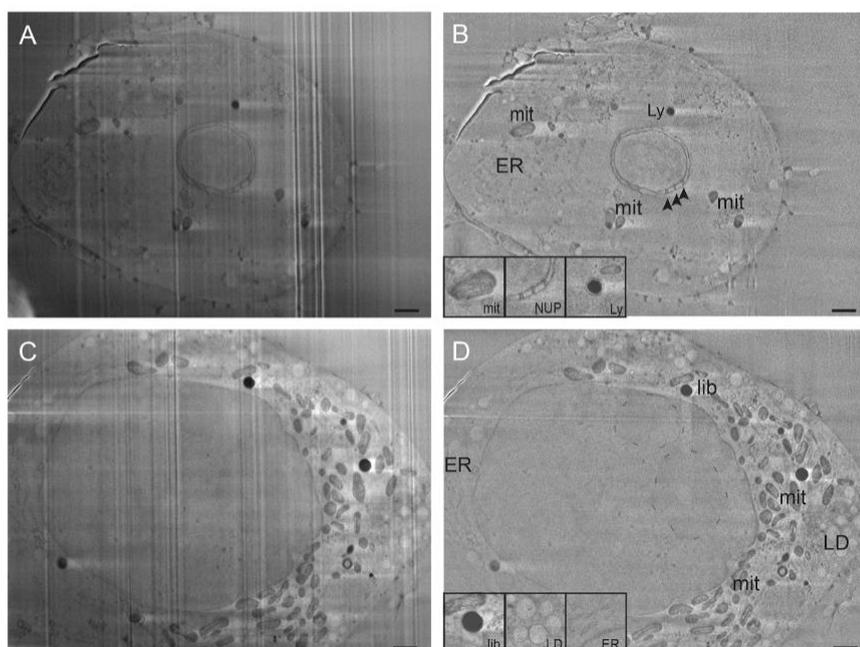


**Fig. 1.** Cryo-FIB-SEM of a HeLa cell grown on grid. A) A slice through a HeLa cell stack displaying a raw SEM image. B) The same cell slice after image processing. A grey dashed line highlights the nuclear envelope and mostly the inner leaflet when the outer one is apparent. S (nuclear speckles), mit (mitochondrion), CP (coated pit). Insets show enlarged views of a mitochondrion and a coated pit. Scale bar 2  $\mu$ m.

that are mostly through the nucleus (Fig. 1). Imaging another HeLa cell within a cell pellet allowed visualization of a larger cytoplasmic area (see below). The contrast of the section allowed direct visualization of the nuclear membrane while being reminiscent of TEM imaging after staining with heavy metal salts despite the fact that none were employed (Fig. 1). The image generated did not need to be inverted as is usual for SEM imaging: membranes appeared darker whereas the cytosol is clear like images acquired by TEM. Overall, chromatin displayed homogeneous density, however there were small regions of higher density that could correlate to a distinct chromatin sub-compartment such as nuclear speckles. In the cytoplasm we could detect one mitochondrion and two coated pits. As this procedure was carried out to produce a lamella, the results obtained are promising for future investigation of the nucleus as they demonstrate the feasibility of recognizing and targeting a region of interest that can subsequently be examined more closely by Cryo-TEM Tomography.

### 1.2. 3D acquisition of a HeLa cell within a cell pellet

HeLa cells, grown in monolayers and incubated overnight with a colloidal gold conjugated antibody directed against RNA polymerase II (RNAPII; see below) were examined by cryo-FIB-SEM. In this case a large volume of the cell (15  $\mu$ m  $\times$  15  $\mu$ m  $\times$  10  $\mu$ m) including both cytoplasm and nucleus could be visualized (Fig. 2). At first sight, the data seem difficult to analyze since the contrast is low, local charge imbalance is apparent and many stripes along the Y axis, known as curtaining or a water fall effect, appear. After removal of these artefacts by image processing (see below) the overall morphology of the cell appeared very similar to that of a resin embedded heavy metal stained HeLa cell and many cytoplasmic compartments and structures could be visualized. The nuclear envelope was clearly defined with its numerous nuclear pores, ribosomes could be observed on the surface of the ER and there was no difficulty to distinguish the cristae of the mitochondria. It should be noticed that the mitochondria matrix appeared extremely dark if compared to the cristae. In addition, a large number of spherical shaped components could be observed within the cytoplasm. Some of



**Fig. 2.** Cryo-FIB-SEM of a HeLa cell pellet. Two selected slices within the HeLa cell stack display a region close to the cell periphery (A and B) or a region obtained after milling more deeply into the cell (C and D). A and C display raw SEM images while B and D display respectively the same cell slices after image processing. The arrowheads in B highlight nuclear pores (NUP) cut transversally, the area in D surrounded in a blue dashed line highlights a dense region within the nucleus corresponding to the nucleolus, ER (endoplasmic reticulum), mit (mitochondria), LD (lipid droplets), Ly (lysosome), lib (lipid body). Insets show enlarged views of a lipid body, lipid droplets and the endoplasmic reticulum. Scale bar 1  $\mu$ m.

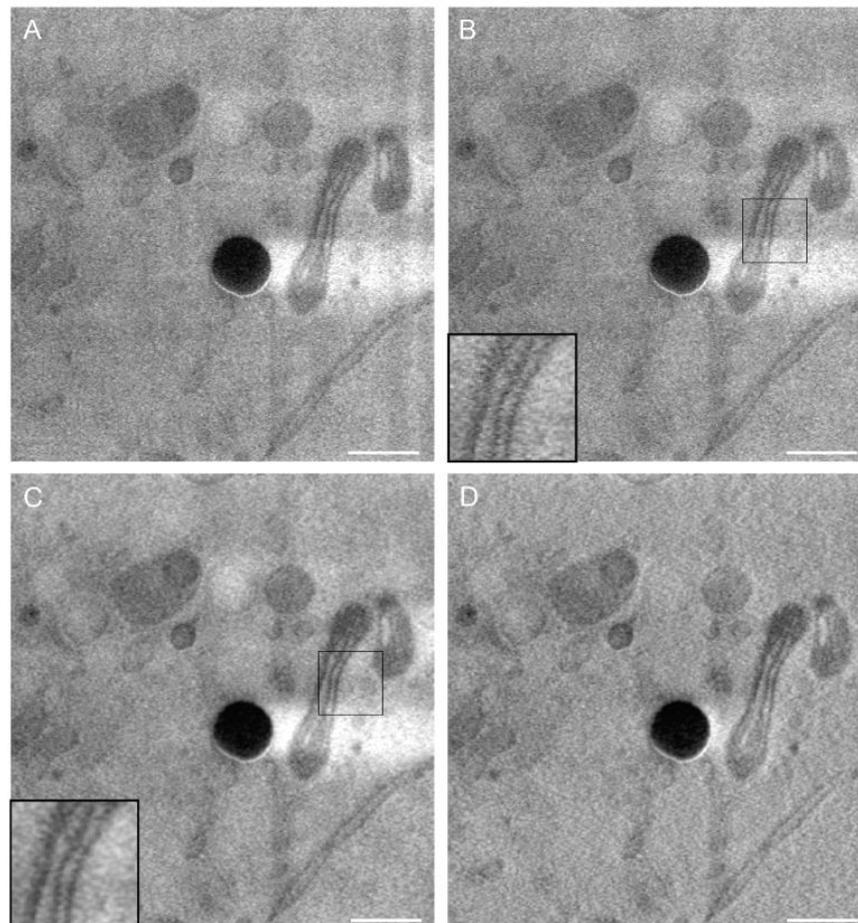
these spherical components are thought to be derived from the lipid-based antibody delivery agent that has been used.

Focusing on the nucleus, we noticed the nuclear membrane with its characteristic pores. The nucleus displayed regions of variable density throughout, one region of higher density could correspond to interchromatin granule clusters also known as nuclear speckles (Galganski et al., 2017). The nucleolus was well defined as commonly observed in chemically fixed samples as based on its central localization as opposed to heterochromatin more visible within the periphery; it displayed subdomains that could correspond to regions previously characterized in chemically fixed samples as the fibrillary center, the dense fibrillary component or the granular component. Interestingly, such a contrasted nucleolus has so far not been reported in CEMOVIS sections.

### 1.1. Image processing

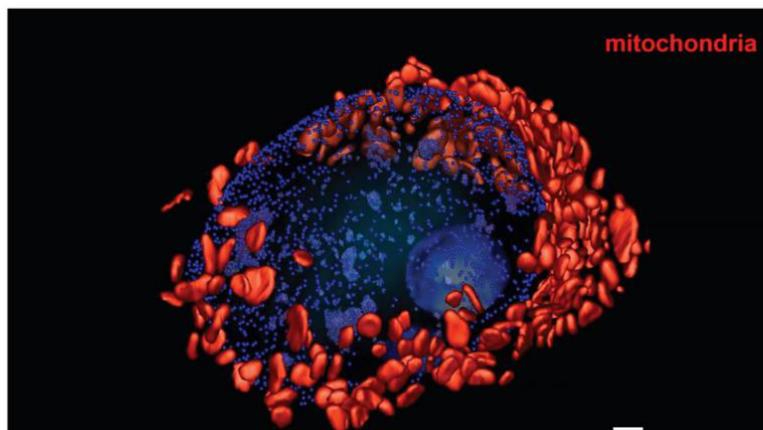
Because of the conditions under which they are acquired (i.e. large, non-conductive surfaces, low voltage, uneven surface topography, differences in local surface potential), the images of the serial surfaces of a cryo-FIB-SEM stack typically suffer several artefacts. During FIB milling, curtaining can occur if there are particles on the surface of the sample or if the sample contains voids or constituents entailing different milling rates. In addition, local charge imbalances induced by the

scanning electron beam may occur in regions around lipid membranes or droplets in which case brighter or darker shadows are visible. These artefacts are probably due to local differences in conductive properties and depend thus on the intrinsic composition of intracellular components. Overall, the most important artefacts are the presence of vertical curtaining, the drift between consecutive images and the presence of horizontal bands with large contrast changes. Furthermore, cryo-FIB-SEM stacks are in some instances characterized by a low signal to noise ratio. To render the interpretation of the image stack easier and to allow for a precise (and possibly semi-automated) segmentation, these artefacts have to be corrected for. To illustrate the typical processing workflow applied in this work (Fig. 3), we selected a region of interest of one of the original images belonging to the stack where, to at least some degree, all the aforementioned artifacts can be observed. The curtaining artefacts (visible on the rightmost part of panel A) are effectively removed using a combined wavelet decomposition and Fourier filtering approach (Fig. 3B). Note that using this approach, the removal of the vertical stripes does not introduce any other artefact nor result in any loss of contrast with respect to the original image (although the stripe removal might be trivial for this image, because of the low intensity of the stripes, the potential of the method can be clearly appreciated in Figs. 1 and 2). Afterwards, the images of the stack were aligned using the Fourier shift theorem and ready to be 3D denoised. To



**Fig. 3.** Typical cryo-FIB-SEM image processing steps. A) A typical raw image of a cryo-FIB-SEM stack showing lipid droplets, mitochondria, nuclear membrane and other cellular vesicles. B) Vertical curtaining stripes have been removed using a combined wavelet decomposition and Fourier filtering approach. C) Image in B denoised using 3D noise2void after drift correction. D) The denoised image in C after greyscale morphological reconstruction. Scale bar 500 nm.

(yellow), lysosomes (orange), nucleus (transparent turquoise), nuclear pores (dark blue), nucleoli (light blue) and speckles (purple) inside the nucleus was reconstructed (Fig. 4D) and is displayed in three dimensions (Supplementary movie S1).



Supplementary movie S1.

The second strategy (Fig. 4E–H) requires powerful computer resources since it works in 3D. It was quite effective on large and well defined structures like mitochondria or lysosomes, but was less effective for the segmentation of the ER since the morphology of the structures is more complex and the thickness of the compartment is close to the voxel size (6.5 nm × 6.5 nm × 30 nm). In addition, the membranes of these compartments sometimes leak and the propagation of the seed is thus no longer limited by the membrane. However, segmentation of the ER shows that it is well developed throughout the cell and many contacts with mitochondria could be observed. The spherical structures have been segmented and at least three populations could be described (Fig. 6A). One population with a light center and a surrounding membrane, their mean size being 415 nm ± 13 nm, are thought to be lipid droplets. Other spherical structures appeared totally black with the InLens secondary electron detector, their mean diameter is 557 nm ± 16 nm and they have been referred to as lipid bodies in previous studies (Vidavsky et al., 2016a). A shadow around them was

observed both in the X and Y axes and some charging effects seem to appear in the bottom of the rim. There are also dark membrane compartments of the same size with a surrounding membrane, their mean diameter is 626 nm (± 30 nm) and their core is often clear. Though it is

difficult to clearly identify these compartments based only on the morphology, such organization is characteristic of lysosomes.

1.1. Cryo-FIB-SEM detection of protein-gold conjugates

In a previous study we used FIB-SEM imaging to localize RNA polymerase II (RNAPII) within the nucleus of HeLa cells after immunolabelling of living cells with colloidal gold-conjugated Fab fragments of a monoclonal antibody directed against RNAPII (Orlov et al., 2015). However, these experiments were carried out on resin embedded fixed cells at room temperature conditions and required a silver enhancement step to visualize ultra-small gold conjugates. Here we wished to examine the feasibility of labelling cells with protein-gold conjugates and subsequent processing under cryogenic conditions where silver enhancement of gold particles could not be carried out. For this purpose we incubated HeLa cells with 2.4 nm GST-gold particle conjugates overnight then scraped the cells from the culture dish and

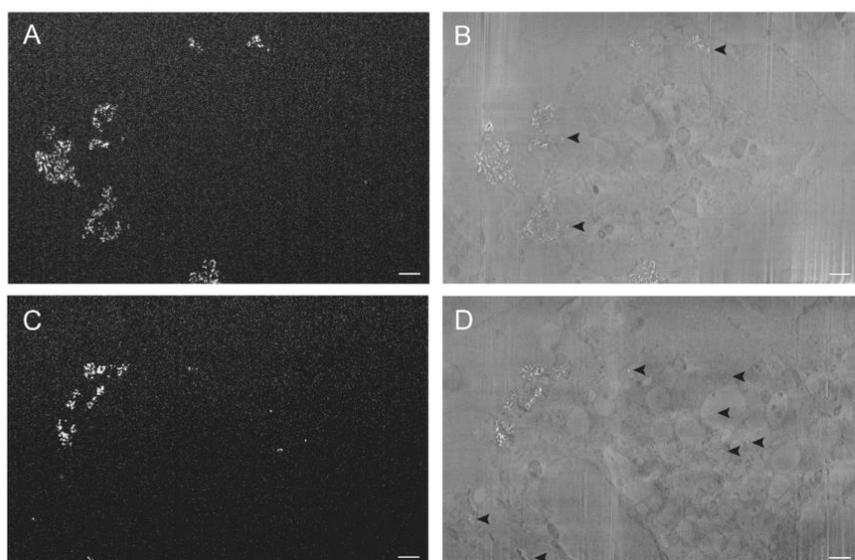
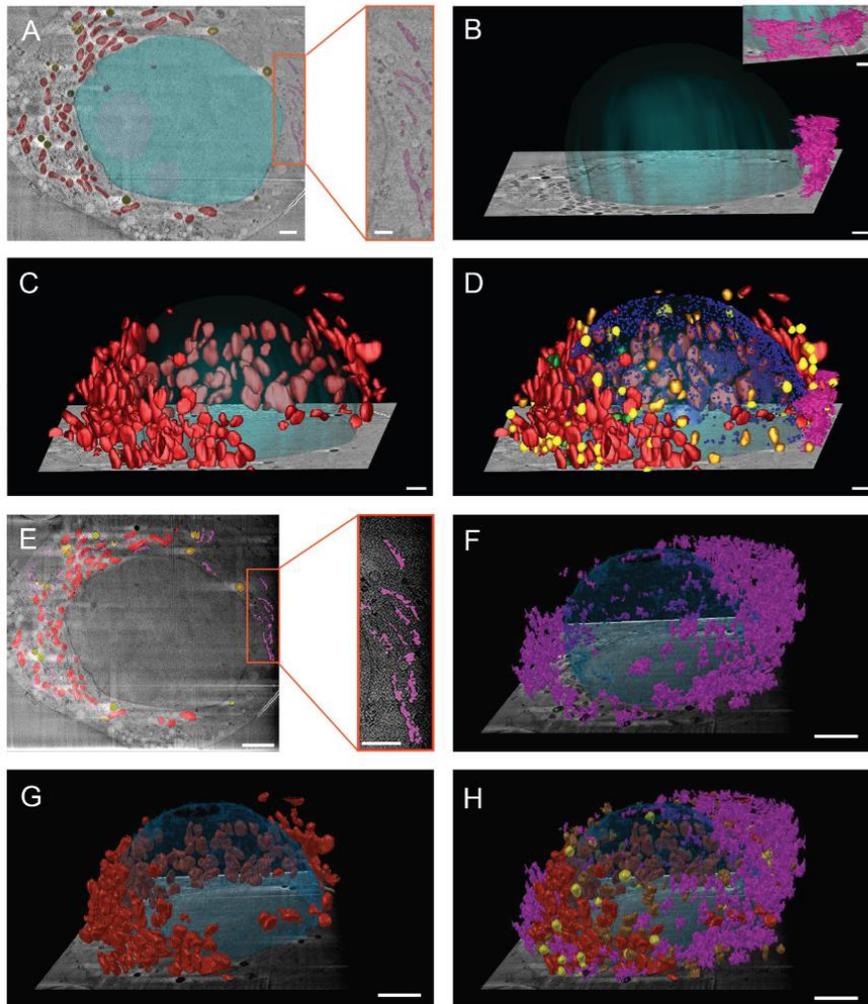


Fig. 5. Cryo-FIB-SEM of a HeLa cell incubated overnight with GST-gold conjugates. Two different sections of the HeLa cell stack are shown. A and B (5 nm pixel size) show a top section of the HeLa cell and C and D (10 nm pixel size) show a section through the nucleus and the cytoplasm of the same regions visualized with the EsB detector (A and C) or the ES detector (B and D). Arrows point to gold particles.



**Fig. 4.** 3D reconstruction of native HeLa cell. Images of both manual (A-D) and semi-automatic (E-H) reconstruction are shown. Different organelles distributed throughout the cell. A) EM image overlay with the segmentation results and a zoom onto the ER region, scale bar 1  $\mu\text{m}$  and 500 nm. B) Part of the ER network and 90° rotated view on the segmented ER region, scale bar 1  $\mu\text{m}$ . C) 3D representation of the mitochondria, scale bar 1  $\mu\text{m}$ . D) 3D representation of all organelles segmented, scale bar 1  $\mu\text{m}$ . E) EM image overlay with the segmentation results and a zoom onto the ER region, scale bar 2  $\mu\text{m}$  and 1  $\mu\text{m}$ . F) 3D representation of the ER network, scale bar 500 nm. G) 3D representation of the mitochondria, scale bar 2  $\mu\text{m}$ . H) 3D representation of all organelles segmented, scale bar 2  $\mu\text{m}$ . Mitochondria (red), lipid bodies (yellow), multivesicular bodies (green), lysosomes (orange), nuclear pores (blue spheres), nucleus (transparent turquoise), nucleoli (transparent blue), nuclear speckles (purple).

this aim, we employed the 3D version of noise2void, a denoising algorithm based on machine learning that does not require clean ground truth data. The algorithm allows for an efficient removal of the statistical noise in the image without any substantial loss in the spatial resolution (compare insets in Fig. 3B and C). Alternatively, similar results can be achieved combining DA3D with non-local denoising filters (see Materials and Methods). Finally, to at least partially correct for the horizontal bright bands appearing on the right side (i.e. the side of the scanning direction) of regions with lower secondary electron generation efficiency (i.e. darkest regions of the image), we used a grayscale morphological reconstruction approach (Materials and Methods). This way, regional maxima in the images can be computed starting from a blurred version of the original image (the mask) which is used to limit the morphological erosion of a seed image. In this case we used as a seed the mask image to which an offset value was added. The computed regional maxima can then be subtracted to the original image and a partially corrected image can be obtained (Fig. 3D). The results obtained after applying these tools to entire cell slices are also illustrated in Figs. 1 and 2.

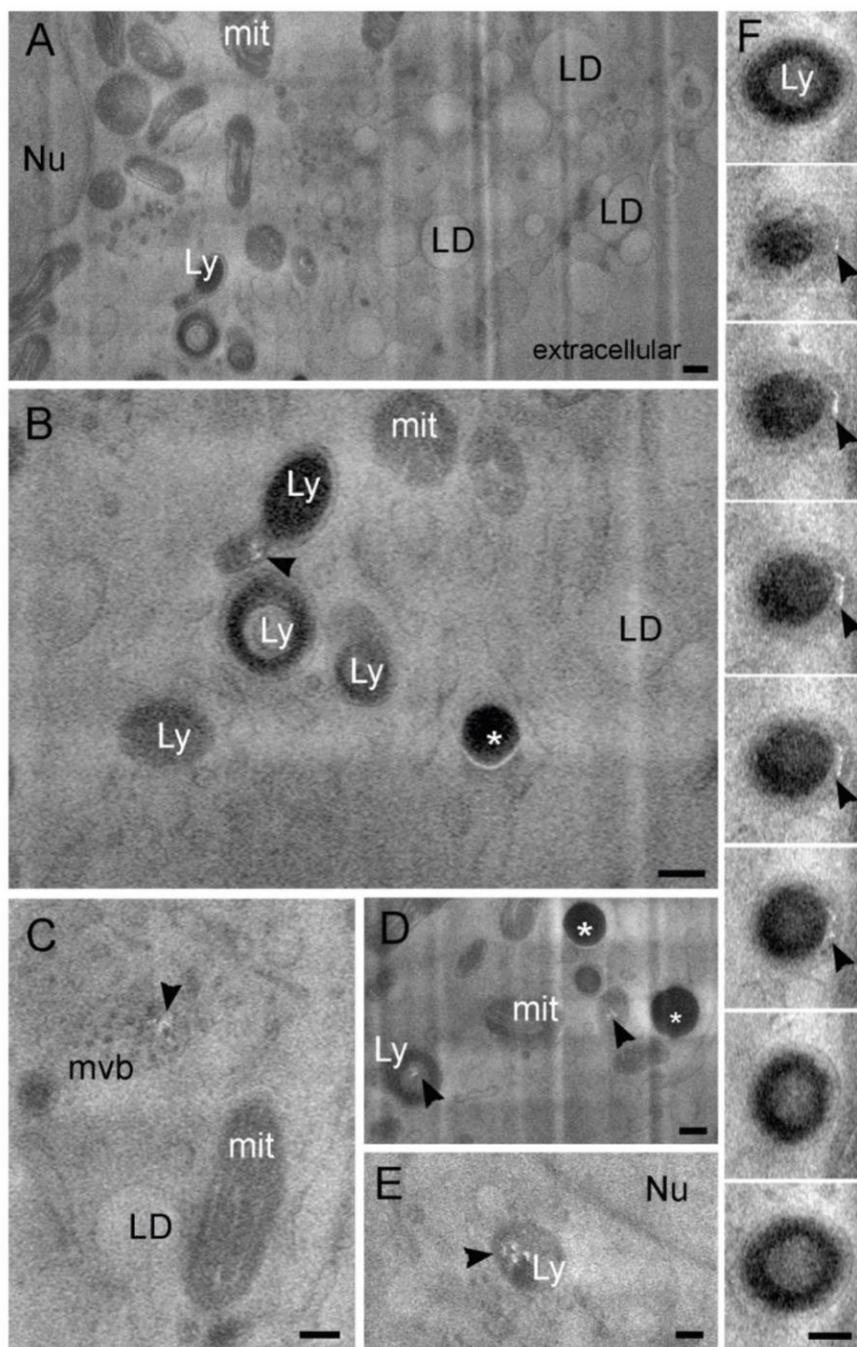
### 1.1. Segmentation

To better understand the ultrastructural organization of the cell and to assess the possibility of 3D quantification on such a dataset, cellular components have been segmented using both IMOD and Ilastik. The first tool relies on the contouring of the objects in 2D whereas the second tool is based on a watershed algorithm that allows a semi-automatic segmentation of the object by the propagation of a seed that grows until it reaches a limiting membrane. The first strategy is without any doubt very precise, it relies only on the user and it could be achieved on a conventional computer. After removing stationary noise, local thresholding could be done more easily than in the raw dataset thus allowing the detection of new features or providing stronger evidence for structures such as nuclear pores or speckles within the nucleus (Fig. 4A-D). The segmentation of mitochondria, lipid bodies and lysosomes shows different distributions and numbers throughout the cell. The mitochondria are more polarized on one side of the cell whereas nuclear pores appear equally distributed throughout

## RESULTATS

D. Spehner, et al.

*Anal. Biochem.* 2013(10) 1055



**Fig. 6.** Cryo-FIB-SEM of a HeLa cell incubated with gold conjugated anti RNAPII antibody. Selected regions of different sections through the HeLa cell stack. A) displays an overview of a cell region including the nucleus, the cytoplasm and the extracellular region. B, C, D, E and F show enlarged areas with gold clusters within a lysosome fusing with an endocytic vesicle (B), within a multivesicular body (C) within lysosomal like structures (D and E). F displays the same lysosome with gold cluster over a series of 5 serial sections within the 8 shown. Nu (nucleus), mit (mitochondrion), LD (lipid droplets), Ly (Lysosomes), mvb (multivesicular body), \* (lipid bodies).

recovered them by centrifugation. No washing step was performed deliberately to ensure the presence of gold particles either outside or inside cells. The cell pellet appeared red due to the presence of the gold particles. Images acquired with the EsB detector (Fig. 5A and C) displayed a dark background with accumulation of bright white clusters or in some instances isolated bright white dots. This corresponds with the expectation of a high EsB signal from high Z elements such as gold while the tissue consisting of low Z elements provides a low back-scattered electron yield. By overlaying the EsB images (Fig. 5A and C) on the simultaneously acquired InLens SE images (Fig. 5B and D) the location of the bright white clusters and dots within the intra- or extracellular ultrastructure could be easily identified. Therefore we

concluded that the clusters and dots corresponded to the gold particles that were either on the outside of cells or had penetrated. Interestingly, gold particles were visualized in endocytic compartments, which are presumably part of the main pathway of their uptake into cells. These results indicate that it is possible to visualize antibody coupled gold conjugates using the cryo-FIB-SEM method.

Having demonstrated the possibility to identify gold particles by cryo-FIB-SEM, we next examined cells that had been incubated in the presence of an antibody delivery agent with slightly larger 2–7 nm gold particles conjugated to Fab fragments of an RNAPII antibody. In this case cell pellets were washed prior to their processing to remove any extracellular

conditions some of the gold-labelled antibody is expected to be found in the nucleus as it will bind to newly synthesized RNAPII that spontaneously migrates to the nucleus. Here we could also detect spherical white particles using the InLens SE detector in endo-lysosomal compartments like multivesicular bodies and lysosomes that probably correspond to gold particles or, more likely, gold clusters (Fig. 6). A series of eight sections through a lysosome containing gold cluster allowed an estimation of the size of the cluster in the range of 150 nm, gold clusters appearing in 5 images out of 8 corresponding to  $\sim 5 \times 30$  nm (thickness of the FIB slicing). No clusters were visible within the nucleus where they presumably would have gained access by virtue of their binding to RNAP II as previously demonstrated using other methods (Orlov et al., 2015). Future investigations should allow detection of immunogold labels in the nucleus by adjusting parameters such the pixel size as well as the nature and size of the gold particles.

## 1. Discussion

Cryo-FIB-SEM has provided a means to access cell and tissue structure under close to native conditions without any artefactual staining or embedding of biological material. From a practical standpoint, the two distinct methods of preparation of cells in pellets or on grids as well as the two methods used for high pressure freezing have provided equivalent results with respect to the organelles observed and contrast. The workflow of image processing tools applied in this study is particularly powerful to correct for many of the artefacts induced during acquisition. When examining images acquired using cryo-FIB-SEM it's important to confront the results to those obtained with more traditional methods. Interestingly, the gray scale images obtained with the SE detector, which are considered to be due to differences in surface potential of chemically distinct elements, turn out to be reminiscent of traditional TEM images with excellent contrast of the general architecture of the cell and its known constituents, after using image processing tools.

While the major cell organelles (nuclei, nucleolus, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus) are well recognized, the clear cut identification of some cellular constituents must await more detailed investigations. For instance, whether the variable nuclear densities noticed in the cryo-SEM images correspond to distinct nuclear areas (euchromatin, heterochromatin or nuclear speckles) or as yet undefined regions remains to be validated. Cryo-TEM of lamella selected after careful milling and imaging of samples to target a region of interest should help to solve some of these issues. In addition, datasets with smaller pixel size and slice thickness will be particularly valuable to gain a better insight into large macromolecular complexes. Similarly, the identification of some compartments requires specific labelling to confirm the morphological clues. In this respect the strategy initiated in this report, should provide a useful tool. Although small immunogold particles measuring a few nanometers are close to the limit of detection of the SEM, a clear-cut signal corresponding to gold particles could be observed in an endo-lysosomal compartment as expected. However, such a signal was hard to detect in the nucleus where the target of the antibody is localized. In fact, in previous studies we could demonstrate binding of internalized gold-labelled RNAPII antibodies in the nucleus after silver enhancement of the signal, albeit not under cryogenic conditions. This demonstrates that a significant amount of gold labelled antibodies can be released from endocytic compartments into the cytoplasm and transported to the nucleus through their attachment to RNAPII. Therefore, further improvement of the method reported here still needs to be carried out to reach a resolution required for resolving the small gold conjugates compatible with intracytoplasmic delivery and nuclear targeting.

3D segmentation has enabled an overall view of the major HeLa cell organelles in their native distribution, size and shape so as to set up a native cell atlas. Such segmentation could be obtained by contouring the objects and by using a watershed algorithm but in any case the

process tends to be time consuming. Clearly, further work needs to be done to train algorithms so that recognition of specific organelles imaged by cryo-FIB-SEM can be done automatically. Interactions between segmented objects will be one of the most promising perspectives that could be reached with this cryo-FIB method. Indeed, this strategy makes it possible to visualize snapshots of dynamic events in a native state, in 3D in its cellular context and in a very short time. So far this is the only technique that combines all of these advantages. Of course, CEMOVIS allows a higher resolution of events, but the thickness of the section cannot exceed 70 nm, the cellular context is thus restricted. Although FIB-SEM at room temperature allows such a 3D cell architecture, one cannot discard the hypothesis that artefacts could be induced by the cryo-substitution and subsequent steps; moreover, this strategy requires a large amount of time to achieve both the cryo-substitution and the polymerization of the sample.

In the future it will be interesting to focus on small regions to get higher throughput for better statistics and higher resolution for better detection of single nanosized gold particles. In addition, cryo-FIB-SEM 3D imaging could be combined with lamellae production in order to specifically target the region of interest that could then be analysed by cryo-tomography using a transmission electron microscope.

Being able to compare the cryo-FIB-SEM method to other methods employing a variety of treatments and sample preparations should help to better understand the living state of the cell and procedures that interfere with cell functions.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01 and Instruct-ERIC, by the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'Avenir program (ANR-15-IDEX-02) for LucasB and PKG. We are grateful to Peter van de Plas, Jan Leunissen, Nadia Groysbeck and Guy Zuber for providing gold labelled conjugates as well as to Robert Drillien for advice on the manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107528>.

## References

- Al-Amoudi, A., Chang, J.J., Leforestier, A., McDowall, A., Salamin, L.M., Norlen, L.P., Richter, K., Blanc, N.S., Studer, D., Dubochet, J., 2004. Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *EMBO J.* 23, 3583–3588.
- Bennet, M., Bertinetti, L., Neely, R.K., Schertel, A., Kornig, A., Flors, C., Muller, F.D., Schuler, D., Klumpp, S., Faivre, D., 2015. Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles. *Faraday Discuss.* 181, 71–83.
- Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C.N., Kausler, B.X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., Eren, K., Cervantes, J.I., Xu, B., Beuttenmueller, F., Wolny, A., Zhang, C., Koethe, U., Hamprecht, F.A., Kreshuk, A., 2019. Ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat. Methods* 16 (12), 1226–1232.
- Chlanda, P., Sachse, M., 2014. Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *Methods Mol. Biol.* 1117, 193–214.
- Dubochet, J., 2018. On the development of electron cryo-microscopy (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57, 10842–10846.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowall, A.W., Schultz, P., 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21, 129–228.
- Galganski, L., Urbanek, M.O., Krzyzosiak, W.J., 2017. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucl. Acids Res.* 45, 10350–10368.
- Groysbeck, N., Stoessel, A., Donzeau, M., da Silva, E.C., Lehmann, M., Strub, J.M.,

- Cianferani, S., Dembele, K., Zuber, G., 2019. Synthesis and biological evaluation of 2.4 nm thiolate-protected gold nanoparticles conjugated to Cetuximab for targeting glioblastoma cancer cells via the EGFR. *Nanotechnology* 30, 184005.
- Hayles, M.F., Stokes, D.J., Phifer, D., Findlay, K.C., 2007. A technique for improved focused ion beam milling of cryo-prepared life science specimens. *J. Microsc.-Oxford* 226, 263–269.
- Jantschke, A., Pinkas, I., Hirsch, A., Elad, N., Schertel, A., Addadi, L., Weiner, S., 2019. Anhydrous beta-guanine crystals in a marine dinoflagellate: structure and suggested function. *J. Struct. Biol.* 207, 12–20.
- Jorstad, A., Blanc, J., Knott, G., 2018. NeuroMorph: a software toolset for 3D analysis of neurite morphology and connectivity. *Front. Neuroanat.* 12, 59.
- Krull, A., Buchholz, T.-O., Jug, F., 2019. Noise2Void-Learning Denoising from Single Noisy Images. [arXiv.org 1811.10980v2](https://arxiv.org/abs/1811.10980v2).
- Kremer, J.R., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.* 116 (1), 71–76.
- Lee, G.R., Gommers, R., Wasilewski, F., Wohlfahrt, K., O’Leary, A., 2019. A Python package for wavelet analysis. *J. Open Source Software* 4 (36).
- Marko, M., Hsieh, C., Schalek, R., Frank, J., Mannella, C., 2007. Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* 4, 215–217.
- Munch, B., Trtik, P., Marone, F., Stampanoni, M., 2009. Stripe and ring artifact removal with combined wavelet - Fourier filtering. *Opt. Express* 17, 8567–8591.
- Orlov, I., Schertel, A., Zuber, G., Klaholz, B., Drilien, R., Weiss, E., Schultz, P., Spehner, D., 2015. Live cell immunogold labelling of RNA polymerase II. *Sci. Rep.* 5, 8324.
- Pierazzo, N., Facciolo, G., 2017. Data adaptive dual domain denoising: a method to boost state of the art denoising algorithms. *Image Process Lin* 7, 93–114.
- Rigort, A., Plitzko, J.M., 2015. Cryo-focused-ion-beam applications in structural biology. *Arch. Biochem. Biophys.* 581, 122–130.
- Robinson, K., Whelan, P.F., 2004. Efficient morphological reconstruction: a downhill filter. *Pattern Recogn. Lett.* 25, 1759–1767.
- Schertel, A., Snaidero, N., Han, H.M., Ruhwedel, T., Laue, M., Grabenbauer, M., Mobius, W., 2013. Cryo FIB-SEM: volume imaging of cellular ultrastructure in native frozen specimens. *J. Struct. Biol.* 184, 355–360.
- Studer, D., Humbel, B.M., Chiquet, M., 2008. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem. Cell Biol.* 130, 877–889.
- Sviben, S., Gal, A., Hood, M.A., Bertinetti, L., Politi, Y., Bennet, M., Krishnamoorthy, P., Schertel, A., Wirth, R., Sorrentino, A., Pereiro, E., Faivre, D., Scheffel, A., 2016. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga. *Nat. Commun.* 7, 11228.
- van der Walt, S., Schonberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., Yu, T., Contributors, S.L., 2014. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2.
- Vidavsky, N., Masic, A., Schertel, A., Weiner, S., Addadi, L., 2015. Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *J. Struct. Biol.* 192, 358–365.
- Vidavsky, N., Addadi, S., Schertel, A., Ben-Ezra, D., Shpigel, M., Addadi, L., Weiner, S., 2016b. Calcium transport into the cells of the sea urchin larva in relation to spicule formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 12637–12642.
- Vidavsky, N., Akiva, A., Kaplan-Ashiri, I., Rechav, K., Addadi, L., Weiner, S., Schertel, A., 2016a. Cryo-FIB-SEM serial milling and block face imaging: Large volume structural analysis of biological tissues preserved close to their native state. *J. Struct. Biol.* 196, 487–495.
- Vincent, L., 1993. Morphological greyscale reconstruction in image analysis: applications and efficient algorithms. *IEEE Trans. Image Process.* 2, 176–201.

## DISCUSSION

Ce travail de thèse a permis de: (1) mettre en place un protocole de microscopie électronique préservant de façon optimale les astrocytes et les autres éléments du neuropile en vue de l'utilisation de la technique d'imagerie par FIB/SEM à haute résolution ; (2) décrire l'ultrastructure complexe des « leaflets » astrocytaires en particulier au niveau de leurs interactions avec les synapses, ainsi que de préciser leur composition en compartiments intracellulaires sous-tendant une signalisation calcique ; (3) montrer le potentiel de la cryo-FIB/SEM pour l'étude de l'organisation des compartiments intracellulaires en 3D et la localisation des protéines avec une préservation du tissu au plus proche de son état physiologique en n'utilisant aucun produit chimique, la fixation du tissu se fait par la vitrification. Ces résultats se placent dans un contexte de discussion scientifique faisant débat, ils révèlent de nouvelles connaissances essentielles à la compréhension de la physiologie astrocytaire et ouvrent de nouvelles perspectives aussi bien techniques que scientifiques pour l'étude des astrocytes.

### I. Préservation de l'ultrastructure des astrocytes

Dans ce travail de thèse, nous avons soulevé la question de la préservation de l'astrocyte en microscopie électronique pour élaborer la meilleure approche pour permettre une étude de l'ultrastructure. Nous avons donc comparé la qualité de préservation de tranche de l'hippocampe de souris dans trois conditions : (1) vitrification des tranches en HPF, (2) fixation avec le glutaraldéhyde par immersion suivie d'une vitrification en HPF et (3) fixation avec le glutaraldéhyde par immersion suivie par une préparation conventionnelle pour la microscopie électronique, tous les échantillons furent finalement enrobés en résine époxy.

Les astrocytes sont des cellules particulièrement sensibles aux changements osmotiques en partie à cause de leur rôle dans le maintien de l'homéostasie ionique, mais aussi parce qu'il y a beaucoup d'aquaporines au niveau de leur membrane plasmique et que ces cellules contiennent beaucoup d'eau. Ces caractéristiques peuvent rendre leur fixation et donc leur observation en microscopie électronique compliquée. Nos résultats n'ont pas démontré de différences significatives de volume extracellulaire ou de structure astrocytaire en lien avec la méthode de fixation. Les dommages

## DISCUSSION

observés semblent être plutôt liés à la coupe au vibratome, car nous avons observé une proportion similaire d'astrocytes œdémateux à travers toutes les conditions.

Les astrocytes ont un rôle central dans l'inflammation et réagissent aux blessures subies par le tissu, cela peut donc se traduire par une modification de leur morphologie. Les autres différences entre les traitements ont déjà été mentionnées par le passé, les artefacts en lien avec les préparations conventionnelles en microscopie électronique sont résolus par la vitrification et la substitution à froid (Möbius et al. 2010a). Nos résultats semblent contredire une étude récente comparant l'espace extracellulaire et la préservation de la morphologie astrocytaire entre des échantillons fixés par aldéhyde en perfusion intracardiaque puis colorés chimiquement à température ambiante, et des échantillons congelés à haute pression puis traités à basse température pour la coloration et la substitution dans la résine. Suite à la fixation aux aldéhydes, les auteurs ont ainsi décrit une réduction de l'espace extracellulaire et des pieds astrocytaires œdémateux ainsi qu'une augmentation de la proportion de prolongements cytoplasmiques astrocytaires associée à une diminution de la densité synaptique dans le neutrophile du cortex chez la souris (Korogod, Petersen, et Knott 2015). La question de la réduction du tissu à la suite de la fixation avec des aldéhydes a été soulevée depuis plusieurs années (Cragg 1980; Schultz, Maynard, et Pease 1957; Van Harreveld et Steiner 1970). Ces études ont cependant montré que la préservation de l'espace extracellulaire lors de la fixation aux aldéhydes était possible en incrémentant de façon progressive la concentration du fixateur (Cragg 1980).

Par la suite, nous avons aussi analysé la préservation du tissu et des astrocytes au cours du temps ; pour cela, les échantillons ont été gardés dans du liquide cérébro-spinal de synthèse (ACSF) oxygéné à 34 °C pendant 1,2 et 3 heures, puis fixé selon les 3 protocoles décrits ci-dessus. De la même façon, peu de différences majeures ont été observées entre les différents temps. Cependant, au cours du temps, des profils de cellules hypoxiques ou d'extraction cellulaire furent plus fréquents dans les tranches. Dans le passé, une étude avait d'ailleurs montré une augmentation de la proportion des astrocytes réactionnels dans les tissus coupés au vibratome puis placés dans l'ACSF oxygéné à 24°C pendant des durées croissantes, des conditions similaires à celles réalisées lors des expériences d'imagerie calcique ou d'électrophysiologie sur des tranches aiguës de cerveaux. La même étude a aussi souligné la rétractation des Leaflet

et autre prolongement cytoplasmique astrocytaire fin, un phénomène qui entraîne une augmentation de l'espace extracellulaire dans le tissu (Takahiro Takano et al. 2014).

Des résultats similaires furent observés suite à une exposition au microscope à deux photons des tranches pendant 20 minutes (mimant ainsi les conditions de travail en imagerie calcique). Nous avons par la suite montré qu'il était possible d'utiliser cette méthodologie en combinaison avec le marquage par infrarouge proche (NIRB) (Bishop et al. 2011) sans créer de dommage supplémentaire à la tranche.

Bien que notre étude semble s'opposer au corpus de données obtenues dans différentes études, elle n'adresse pas exactement la même question. L'étude de Korogrod et al. ainsi que l'étude de Takano et al. comparent des échantillons de cortex issus de tranches de cortex fraîchement vitrifiées pour la première, et gardées dans l'ACSF oxygéné puis préparées de façon conventionnelle pour la microscopie électronique avec des échantillons de cortex fixés par perfusion avec une forte concentration en aldéhyde pour la seconde (au moins 4% avec un minimum de 2% de Glutaraldéhyde et 2% de Paraformaldéhyde) (Korogrod, Petersen, et Knott 2015; Takahiro Takano et al. 2014). Dans notre étude, nous n'avons travaillé que sur des tranches fraîches de cerveau fixées ou vitrifiées après la coupe au vibratome avec une concentration réduite en aldéhyde (1.6% Glutaraldéhyde) pour prévenir au maximum de toute perturbation liée à un déséquilibre osmotique dans la tranche. De cette façon, nous n'évitons pas les réactions inhérentes à la coupe du tissu, mais, au moins, nous avons comparé l'effet de la fixation dans des conditions semblables. En effet, il est probable que la fixation par perfusion entraîne des profils différents d'organisation du tissu qui soient différents uniquement dans le cas d'une fixation d'une tranche par immersion, simplement parce que le volume du cerveau est contraint au sein de la boîte crânienne dans le premier cas. Ceci pourrait expliquer, en partie, le très faible espace extracellulaire observé à la suite d'une perfusion intracardiaque dans les deux études citées précédemment. Il est donc possible que la fixation par perfusion, lorsqu'elle est réalisée en prenant en compte l'osmolarité de la solution, permette une préservation plus proche de l'état physiologique de la structure du tissu.

Cette première étude nous a donc permis d'établir les conditions optimales pour préparer des tissus en vue d'imager les astrocytes avec la technique du FIB/SEM. En utilisant une approche hybride qui couple la fixation par perfusion avec des aldéhydes et la congélation haute pression des échantillons, nous obtenons une préservation

## DISCUSSION

optimale du tissu. Nous avons aussi déterminé la fenêtre de temps idéale pour obtenir une bonne préservation du tissu, et en particulier des astrocytes, grâce à un bon contrôle des conditions de préservation de la tranche fraîche après la coupe compatible avec la réalisation d'expériences d'imagerie calcique avant la fixation du tissu, afin de réaliser des études structurales en microscopie électronique. Ce faisant, nous avons également exploré la question de la corrélation de l'imagerie calcique avec la microscopie électronique FIB/SEM avec la méthode du « near infrared branding » (NIRB). Nous avons alors montré que cette méthode n'entraîne pas plus de dommages structurels supplémentaires au tissu que ceux inhérents au marquage.

### II. Corrélats morphologiques des microdomaines calciques des prolongements les plus fins de l'astrocyte : un site de communication avec les synapses

Dans cette étude, nous avons obtenu 3 piles d'images en FIB/SEM au sein du gyrus denté de l'hippocampe. Dans ces trois volumes, nous avons reconstruit les fragments d'astrocytes ainsi que les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Pour identifier les « leaflets » et les prolongements cytoplasmiques plus larges de l'astrocyte, nous avons séparés les prolongements astrocytaires par leurs diamètres, ce qui nous a permis d'identifier deux sous-domaines de l'astrocyte : les « leaflets » correspondant à toutes les structures de l'astrocyte ayant un diamètre inférieur à 200 nm et les « main processes » (MP) qui sont toutes les structures ayant un diamètre supérieur à 200 nm. À partir de ce critère de ségrégation, nous avons pu confirmer que les leaflets sont des prolongements astrocytaires avec un haut SVR (surface to volume ratio) en comparaison avec les MPs confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment par d'autres équipes, avec d'autres méthodes de ségrégation (Gavrilov et al. 2018).

Cependant, nous avons observé que les « leaflets » ne constituent pas une population uniforme. En effet, une partie de cette population est extrêmement petite et ressemble plus à de petits filopodes, tandis que d'autres servent d'éléments de connexions entre deux MPs, ou tout du moins, représentent un canal de contraction cytoplasmique entre deux portions de MP. Enfin, une partie de ces « leaflets » a un large volume et semble être organisée en domaine complexe fonctionnel et possède des caractéristiques morphologiques spécifiques. Bien que les « leaflets » soient des structures fines, certaines d'entre elles occupent un volume important.

De plus, les « leaflets » s'organisent en domaine formant de nombreux contacts entre elles. Nous proposons d'appeler ces domaines « la canopée ». Nous avons d'ailleurs

observé, bien que nous ne l'ayons pas quantifié, l'existence de leaflet se repliant et se contactant elle-même, une observation qui a aussi été réalisée dans une autre étude en microscopie électronique récemment (Kiyoshi et al. 2020). Si en microscopie optique à haute résolution (STED) il a été rapporté que des structures formant des anneaux cytoplasmiques étaient présentes au sein de l'astrocyte, ce que nous avons pu voir laisse cependant penser qu'il n'y a pas une continuité du cytoplasme de l'astrocyte l'intérieur des structures réflexives pouvant exister. Il est possible que le manque de résolution en STED entraîne une mauvaise interprétation de la structure des domaines astrocytaires (Arizono et al. 2020). Il y a peu de structure semblable à des anneaux observés en microscopie électronique dans nos études, et quand celles-ci existent, elles sont essentiellement dues à des repliements astrocytaires sans fusion des membranes. Ces anneaux ne sont pas une structure ubiquitaire au sein des domaines de la « canopée ».

L'astrocyte est souvent localisé à proximité des synapses, et en particulier des fentes synaptiques. Nous avons segmenté 878 synapses et nos résultats montrent que 76% de larges épines (volume > 0.025  $\mu\text{m}^3$ ) et 63% des petites sont en contact direct avec l'astrocyte. De façon plus générale, la membrane de l'astrocyte est présente à 100 nm de la fente synaptique pour 70% des synapses et à 500 nm pour 93% d'entre elles. On retrouve d'ailleurs des données similaires dans la littérature avec entre 40-90% des synapses contactées par l'astrocyte (Kikuchi et al. 2020 ; Witcher, Kirov, et Harris 2007). Ici, nous précisons que 98% des contacts directs sont formés entre les « leaflets » et la synapse.

La surface de contact observé entre la fente synaptique et l'astrocyte est corrélée avec la taille de l'épine dendritique. Il a été montré en microscopie électronique que lorsqu'une connexion synaptique se renforce, l'épine dendritique devient plus large, la largeur de l'épine est d'ailleurs corrélée à la taille des PSDs (Borczyk et al. 2019). De plus, des études en microscopie optique ont montré que l'interaction entre l'astrocyte et les synapses est maintenue dans le cas où la connexion synaptique sera renforcée et que ce contact assurerait la pérennité de la synapse (Nishida et Okabe 2007). La plasticité neuronale s'accompagne également de remaniements morphologiques au niveau des prolongements fins de l'astrocyte, permettant ainsi une augmentation de la surface de contact pour couvrir la fente synaptique de façon plus importante.

## DISCUSSION

Nos données apportent un point de nouveauté considérable. Nous montrons en effet que des « leaflets » ensemble elles constituent les domaines que nous avons choisi d'appeler « la canopée ». Ces domaines peuvent contacter jusqu'à 100 synapses et occupent un volume de  $280 \mu\text{m}^3$ . Il est très difficile de les différencier, car elles forment des contacts très étroits et certaines d'entre elles forment des contacts avec elles-mêmes. On peut cependant estimer qu'une « leaflet » contacte jusqu'à 30 synapses en même temps, le volume des « leaflets » est d'ailleurs proportionnel au nombre de synapses contactées par ces dernières. En bordure de ces « canopées » se trouvent les « MP » de l'astrocyte qui eux ne contactent que très peu de synapses. Les interactions de l'astrocyte sont souvent vues à l'échelle d'une synapse, on parle d'ailleurs de synapses tripartites où un PAP est associé avec une synapse ; ici nous suggérons une organisation en réseau tripartite du neuropile.

Nous avons ensuite étudié la distribution des organelles comme le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie, deux compartiments impliqués dans la signalisation calcique. Le réticulum endoplasmique est abondant dans les MP et forme des contacts avec les mitochondries. Ce réticulum est essentiellement formé de feuillettes bien que certaines de ses extensions soient sous forme tubulaire et peut s'étendre au sein des « leaflets ». Nous avons par ailleurs montré qu'il existe des saccules du réticulum endoplasmique dans les « leaflets » qui ont des caractéristiques spécifiques : ces saccules sont jusqu'à cent fois moins volumineuses que celles présentes dans les autres domaines de l'astrocyte, de plus elles ne sont jamais en contact avec les mitochondries. Pour distinguer ces deux populations de réticulum, nous avons choisi de les désigner par les termes de : « Complexe-ER » (C-ER), par allusion aux contacts avec la mitochondrie, et « Isolated-ER » (I-ER).

Nous avons également démontré que les mitochondries ne sont présentes que dans les MP, en tous cas dans les fragments d'astrocytes que nous avons étudiés. Certaines portions particulières de la mitochondrie sont retrouvées dans des parties de « leaflets » réalisant la jonction entre deux MP. Ces portions particulières de « leaflets » ont un diamètre de 70 nm maximum et peuvent atteindre jusqu'à  $1,85 \mu\text{m}$  de long. Ces structures sont connues et sont communément appelées nanotunnel. Elles sont impliquées dans la communication entre les mitochondries ou dans les mécanismes de fission/fusion mitochondriale (Vincent et al. 2017).

Dans le passé, les études ultrastructurales menées en microscopie électronique 3D affirment qu'il n'y a pas d'organelle dans les « leaflets » (Gavrilov et al., 2018; Patrushev et al., 2013). Cependant, nos résultats sont en accord avec des résultats obtenus récemment en microscopie électronique qui montrent la présence de réticulum endoplasmique dans certains PAPs (Aboufares El Alaoui et al. 2021). Cette différence d'observation est certainement due à la technologie FIB/SEM ce qui permet d'obtenir une résolution de 4x4x4 nm alors que la technique de SBF/SEM a une résolution qui est limitée à 50 nm sur l'axe Z. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de vésicule dans les « leaflets » contrairement à ce qui fut reporté très récemment (Kiyoshi et al. 2020). Il est possible que les structures répertoriées comme « vesicular-like structure » dans cette dernière étude ne soient que de petit saccule de réticulum. En effet, le critère de ségrégation des auteurs étant la reconnaissance de ces structures à travers plus d'une image comme leur résolution en Z est de 75 nm, ces structures identifiées sont plus grandes que des vésicules (50 nm). Cependant, les petits saccules de réticulum que nous avons identifié peuvent ne pas se retrouver à 75 nm de leur première observation.

Ces résultats obtenus en étudiant la morphologie de l'astrocyte ont permis d'orienter les expériences d'imagerie calcique réalisées au sein de l'équipe du Professeur Andréa Volterra du Département des Neurosciences fondamentales de Lausanne (DNF). Ces expériences sont encore en cours d'analyse. L'observation de l'activité calcique au sein du gliapil (ou domaine spongiforme), dans des régions sans mitochondrie et contenant de nombreuses synapses, pourrait confirmer qu'il existe une activité calcique indépendante de la mitochondrie au sein de l'astrocyte. Ces résultats sembleraient tomber sous le sens, car on sait que 80% de la signalisation calcique de l'astrocyte se passe au niveau du gliapil (Bindocci et al. 2017). Comme ces domaines sont constitués essentiellement de « leaflets » et sont dépourvus de mitochondries, cette signalisation ne peut donc être médiée que par le RE ou des canaux ioniques à la membrane astrocytaire.

Ensuite, grâce à la technique d'immunomarquage à l'or, nous avons pu démontrer la présence de récepteurs IP<sub>3</sub>Rs au sein des « leaflets » sur les saccules d'I-ERs et à proximité des synapses. Pour préciser l'origine du signal calcique observé dans les prolongements les plus fins de l'astrocyte, des mêmes expériences ont été réalisées chez des souris KO pour les récepteurs IP<sub>3</sub>Rs dans les astrocytes. Les résultats, si ils

## DISCUSSION

montrent la disparition entière, ou en partie, des oscillations en concentration calciques observées précédemment pourraient conforter le rôle des isoformes des récepteurs IP<sub>3</sub>Rs dans la signalisation calcique astrocytaire (Mark W. Sherwood et al. 2021). Cette question est cependant encore sujette à débat. Récemment, une étude a affirmé que seule la mitochondrie était responsable de la formation de microdomaines calciques dans l'astrocyte. Dans cette étude, il a été montré que la signalisation calcique observée était indépendante des récepteurs IP<sub>3</sub>R<sub>2</sub>s ; il est cependant regrettable que la présence possible de récepteurs IP<sub>3</sub>Rs d'autres isoformes comme l'isotype 1 n'ait pas été prise en compte (Agarwal et al. 2017). Il a d'ailleurs récemment été postulé que cette isoforme pouvait être dominante dans les sous-domaines astrocytaires qui sont proches des synapses, c'est-à-dire : les « leaflets » (Mark W. Sherwood et al. 2021).

Enfin, nous avons observé des ribosomes au niveau de la membrane de l'ensemble des saccules du réticulum endoplasmique au sein des « leaflets ». Ceci confirme l'hypothèse d'une traduction locale au niveau des prolongements fins de l'astrocyte comme les « leaflets ». Cette activité de transcription locale pourrait être nécessaire à la synthèse de gliotransmetteur et la production de récepteurs membranaires nécessaires aux fonctions de l'astrocyte dans la régulation de la maintenance du réseau synaptique (Sakers et al. 2017 ; Mazaré et al. 2020). De plus, chacun de ces RE forme des contacts avec la membrane plasmique de l'astrocyte. Il est donc possible que ce RE participent à la sécrétion de molécules indépendantes de l'appareil de Golgi (Prudovsky et al. 2008).

Notre étude de l'organisation ultra-structurale de l'astrocyte et de la signalisation calcique du domaine spongiforme nous a donc permis de fournir un nouveau modèle de l'astrocyte. Les « leaflets » de l'astrocyte s'organisent en domaines larges dépourvus de mitochondrie et constituent le sous-domaine privilégié de contacts entre l'astrocyte et les synapses. Dans ce domaine, il existe une signalisation calcique, les microdomaines, qui est dépendante du RE. Le RE présent dans les leaflets pourrait donc être un rôle premier dans l'activité calcique locale dans l'astrocyte. Sa capacité putative à synthétiser de nouvelles protéines pourrait permettre de réguler une grande partie des relations de l'astrocyte avec les synapses.

Il est certainement possible que les voies de signalisation calciques impliquées dans les « leaflets » mettent en jeu tout particulièrement les récepteurs métabotropiques, tels que les mGluRs, P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> ou CBD<sub>1</sub>. Ces derniers permettent la libération d'ions Ca<sup>2+</sup> du

réticulum dans ces régions en réponse à l'activité synaptique (Kellner et al. 2021; Jourdain et al. 2007; Castro et al. 2011; Santello, Toni, et Volterra 2019a; Navarrete, Díez, et Araque 2014). Il a d'ailleurs été montré, sur des astrocytes en culture, que l'activité des récepteurs mGluR5s permet la réorganisation du cytosquelette de l'astrocyte via l'interaction des voies de signalisation de ces récepteurs avec les ezrins (Lavialle et al. 2011), ce qui pourrait expliquer la corrélation observée dans notre étude entre la taille des épines dendritiques et l'augmentation de la surface de contact entre l'astrocyte et la fente synaptique.

Les rôles des compartiments de réticulum endoplasmique présents dans les « leaflets » pourraient ne pas être restreints à une activité locale, ce qui conforterait le concept de la « synapse tripartite ». Il est de bon aloi de penser que ces saccules d'I-ERs puissent permettre l'intégration d'un signal local pour, lorsque nécessaire, se propager par la suite et permettre ainsi une synchronisation du réseau à l'échelle des domaines de la canopée puis de l'astrocyte. En effet, si des événements faibles et rapides sont produits en conditions normales, on peut aussi faire l'hypothèse d'un système de cascade de signaux permettant la transduction de micro événements calciques à une plus grande échelle. On sait, d'après nos résultats que l'ablation des récepteurs IP<sub>3</sub>Rs ne réduit pas à zéro la signalisation calcique observée dans les domaines de la canopée, d'autres canaux calciques jouent certainement un rôle, au moins partiel, dans la signalisation de l'astrocyte.

On peut donc postuler qu'une faible activité du réseau neuronal va engendrer des tressaillements locaux de la signalisation dans l'astrocyte. Une plus forte activité engendrera une réponse métabotrope entraînant une signalisation calcique plus importante due à une cascade d'événements entraînant la signalisation IP<sub>3</sub>Rs, celle-ci pouvant être facilitée par des mécanismes de libération du calcium induite par le calcium (Calcium induce calcium release ; CICR). Par la suite, lorsque la concentration locale en calcium atteint un palier, le signal se propage au sein de l'astrocyte permettant la libération de calcium d'autres saccules du RE dans une autre localité des prolongements astrocytaires. Dans ce modèle, les saccules de RE joueraient donc le rôle de relais locaux pour la transduction du signal puis un signal arrivant dans le MP entraînera une réponse des C-ERs présents dans ce domaine. Comme le C-ER forme des interactions avec la mitochondrie, ce qui permet un échange de calcium, il est

## DISCUSSION

possible qu'une partie de la signalisation engendrée s'accompagne d'une entrée de calcium dans la mitochondrie.

Un signal au niveau de la mitochondrie pourrait alors permettre de réguler sa fonction métabolique, mais peut aussi engendrer des remaniements morphologiques du réseau mitochondrial. Il a d'ailleurs été observé que les mitochondries de l'astrocyte sont motiles en réponse à la signalisation calcique (Jackson and Robinson, 2018). Ce phénomène pourrait permettre d'apporter l'énergie là où elle est nécessaire dans l'astrocyte pour qu'il puisse assurer son rôle dans le réseau. Il a d'ailleurs aussi été postulé récemment dans une étude (en « pré-impression ») que des récepteurs métabotropiques (CBD1) présents sur la membrane de l'astrocyte, mais aussi sur la membrane mitochondriale, participeraient au mécanisme de potentialisation latéral au sein du réseau synaptique (Serrat et al. 2020). Ces récepteurs pouvant provoqués la libération de calcium du RE (Navarrete et Araque 2008), ils ont donc la capacité de créer une libération de calcium en périphérie de la mitochondrie au niveau des MERCs (Krols et al. 2016). Cette dernière donnée pourrait expliquer une partie de la signalisation astrocytaire observée au niveau de la mitochondrie (Agarwal et al. 2017). Enfin, l'organisation en réseau très large du RE dans les MP pourrait expliquer les grandes vagues calciques observées dans les astrocytes, qui sont dépendantes des récepteurs IP<sub>3</sub>R<sub>2</sub>s (Castro et al. 2011 ; Okubo et al. 2019 ; Petravicz, Fiacco, et McCarthy 2008 ; Takata et al. 2013). Ces vagues permettraient ainsi l'intégration de l'information à l'échelle de la cellule offrant ainsi une possibilité de réorganisation morphologique et fonctionnelle.

### III. La microscopie électronique cryogénique 3D, une perspective pour l'étude de l'astrocyte ?

Nous avons vu plus haut que la préservation de la structure cellulaire pour la microscopie électronique est un sujet de débat, de nombreux efforts sont déployés pour conserver l'ultrastructure au plus près de son état natif. Dans le cadre d'une collaboration avec l'université de Strasbourg, j'ai eu l'occasion de travailler sur une pile d'images d'une demi-cellule HELA acquise avec un cryo-FIB/SEM avec un voxel anisotropique de 16\*16\*30 nm. La cellule a été cryo immobilisée par « high pressure freezing » et les acquisitions ont été réalisées à -160 °C. Comme il n'y a pas de coloration, ni de produit chimique, les images acquises permettent de visualiser la cellule dans son état natif, mais le contraste est très faible et la morphologie des

organelles est difficile à analyser. Ces acquisitions ont donc nécessité un traitement d'image particulier pour permettre leur utilisation. D'une part, il a fallu corriger le déséquilibre de charge local et débruiter l'image. Enfin, pour la segmentation semi-automatique des images, les contrastes ont été augmentés et la pile d'images a été séparée en quatre pour faciliter la segmentation qui requiert d'importantes ressources informatiques. De nombreux éléments cellulaires ont pu être identifiés tels que le noyau, les pores nucléaires, les mitochondries, l'appareil de Golgi, des inclusions lipidiques et les lysosomes, mais aussi le réticulum endoplasmique.

Pour analyser la faisabilité de cette technique pour des études ultérieures, la cellule a été reconstruite à l'aide d'outils de segmentation manuelle (IMOD; Kremer, Mastronarde, et McIntosh 1996), comme de segmentation automatique tel Ilastik (Berg et al. 2019). Nous avons ainsi constaté que le contraste est suffisant pour permettre une compréhension du tissu et sa segmentation, la segmentation du RE a toutefois été éprouvante. En tout état de cause, la technique semble prometteuse pour permettre une meilleure compréhension de l'ultrastructure cellulaire, bien que du travail reste à faire pour améliorer les contrastes obtenus.

A l'avenir, la microscopie électronique cryogénique, et en particulier le cryo-FIB/SEM, peut devenir un outil de choix pour imager de larges volumes de tissu sans altérer la morphologie cellulaire. Néanmoins, la résolution n'est pas encore optimale, du travail reste à faire pour obtenir une résolution similaire à celle du FIB/SEM sur des échantillons en résine. Cet outil est cependant prometteur pour développer de nouvelle stratégie de corrélation entre la microscopie optique et électronique en biologie cellulaire (CLEM) étant donné qu'il est possible aujourd'hui de faire de la microscopie optique sur des échantillons cryo-immobilisés ; cela signifie qu'il sera possible à l'avenir d'imager un même échantillon dans les mêmes conditions selon ces deux modalités. Dans la perspective qui nous intéresse, par exemple, un astrocyte étudié en imagerie calcique pourra être visualisé en cryo-CLEM pour autant qu'une protéine aura été étiquetée avec la GFP dans l'astrocyte. Les cryo-FIB-SEM ont déjà été utilisés pour obtenir des images de cellules (Sviben et al. 2016), mais aussi de tissu (Vidavsky et al. 2016) comme le nerf optique du rat (Schertel et al. 2013).

#### IV. Conclusion et perspective

Mises bout à bout, les études effectuées durant ma thèse ont permis de mettre en place un protocole de préparation des échantillons pour la microscopie électronique

## DISCUSSION

reposant sur la vitrification des échantillons pour conserver au maximum l'intégrité du tissu et de l'astrocyte ([Article 1](#)). Nous avons, grâce à ces protocoles, démontré l'existence de domaine de Leaflet : les domaines qui forment une canopée entourant les MP de l'astrocyte. Ces domaines sont dépourvus de mitochondrie et contactent de nombreuses synapses tout en étant compétents pour une signalisation calcique dépendante des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et pour la transcription locale. Nous saurons bientôt si les domaines de la canopée montrent une signalisation calcique particulière due à l'organisation mise en évidence dans cette thèse. Cette signalisation pourrait permettre l'intégration du signal au niveau du neuropile ouvrant donc ainsi la voie à une vision des interactions neurones/astrocytes en réseau tripartite plutôt qu'une vision basée sur des synapses tripartites isolées ([Article 2](#)). Enfin, notre dernière étude démontre la possibilité d'utiliser la microscopie électronique cryogénique 3D pour l'étude de l'ultrastructure cellulaire avec des méthodes de traitements d'images récentes et semi-automatiques ([Article 3](#)). Notre travail ouvre donc d'autres horizons pour l'étude des astrocytes aussi bien sur le plan technologique que sur le plan conceptuel.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N. Joan, Lars Rönnbäck, et Elisabeth Hansson. 2006. « Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier ». *Nature Reviews. Neuroscience* 7 (1): 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>.
- Aboufares El Alaoui, Amina, Molly Jackson, Mara Fabri, Luisa de Vivo, et Michele Bellesi. 2021. « Characterization of Subcellular Organelles in Cortical Perisynaptic Astrocytes ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14 (janvier): 573944. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.573944>.
- Achanta, Radhakrishna, Appu Shaji, Kevin Smith, Aurelien Lucchi, Pascal Fua, et Sabine Süsstrunk. 2012. « SLIC Superpixels Compared to State-of-the-Art Superpixel Methods ». *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 34 (11): 2274-82. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2012.120>.
- Adamsky, Adar, Adi Kol, Tirzah Kreisel, Adi Doron, Nofar Ozeri-Engelhard, Talia Melcer, Ron Refaeli, et al. 2018. « Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement ». *Cell* 174 (1): 59-71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>.
- Agarwal, Amit, Pei-Hsun Wu, Ethan G. Hughes, Masahiro Fukaya, Max A. Tischfield, Abraham J. Langseth, Denis Wirtz, et Dwight E. Bergles. 2017. « Transient opening of the mitochondrial permeability transition pore induces microdomain calcium transients in astrocyte processes ». *Neuron* 93 (3): 587-605.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.034>.
- Agulhon, Cendra, Jeremy Petravicz, Allison B. McMullen, Elizabeth J. Sweger, Suzanne K. Minton, Sarah R. Taves, Kristen B. Casper, Todd A. Fiacco, et Ken D. McCarthy. 2008. « What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology? » *Neuron* 59 (6): 932-46. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.004>.
- Ahmadpour, Noushin, Meher Kantroo, et Jillian L. Stobart. 2021. « Extracellular Calcium Influx Pathways in Astrocyte Calcium Microdomain Physiology ». *Biomolecules* 11 (10): 1467. <https://doi.org/10.3390/biom11101467>.
- Al-Amoudi, Ashraf, Jiin-Ju Chang, Amélie Leforestier, Alasdair McDowall, Laurée Michel Salamin, Lars P. O. Norlén, Karsten Richter, Nathalie Sartori Blanc, Daniel Studer, et Jacques Dubochet. 2004. « Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections ». *The EMBO Journal* 23 (18): 3583-88. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600366>.
- Alvarez, Jorge Ivan, Takahiro Katayama, et Alexandre Prat. 2013. « Glial influence on the Blood Brain Barrier ». *Glia* 61 (12): 1939-58. <https://doi.org/10.1002/glia.22575>.
- Amaral, David G., Helen E. Scharfman, et Pierre Lavenex. 2007. « The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies) ». *Progress in brain research* 163: 3-22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5).
- Amiry-Moghaddam, Mahmood, et Ole P. Ottersen. 2003. « The Molecular Basis of Water Transport in the Brain ». *Nature Reviews Neuroscience* 4 (12): 991-1001. <https://doi.org/10.1038/nrn1252>.
- Araque, Alfonso, Vladimir Parpura, Rita P. Sanzgiri, et Philip G. Haydon. 1999. « Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner ». *Trends in Neurosciences* 22 (5): 208-15. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6).

## BIBLIOGRAPHIE

- Arizono, Misa, V. V. G. Krishna Inavalli, Stéphane Bancelin, Mónica Fernández-Monreal, et U. Valentin Nägerl. 2021. « Super-Resolution Shadow Imaging Reveals Local Remodeling of Astrocytic Microstructures and Brain Extracellular Space after Osmotic Challenge ». *Glia* 69 (6): 1605-13. <https://doi.org/10.1002/glia.23995>.
- Arizono, Misa, V. V. G. Krishna Inavalli, Aude Panatier, Thomas Pfeiffer, Julie Angibaud, Florian Levet, Mirelle J. T. Ter Veer, et al. 2020. « Structural Basis of Astrocytic Ca<sup>2+</sup> Signals at Tripartite Synapses ». *Nature Communications* 11 (1): 1906. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15648-4>.
- Aten, Sydney, Conrad M. Kiyoshi, Emily P. Arzola, Jeremy A. Patterson, Anne T. Taylor, Yixing Du, Ally M. Guiher, et al. 2022. « Ultrastructural View of Astrocyte Arborization, Astrocyte-Astrocyte and Astrocyte-Synapse Contacts, Intracellular Vesicle-like Structures, and Mitochondrial Network ». *Progress in Neurobiology* 213 (mars): 102264. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102264>.
- Attwell, David, Alastair M. Buchan, Serge Charpak, Martin Lauritzen, Brian A. MacVicar, et Eric A. Newman. 2010. « Glial and Neuronal Control of Brain Blood Flow ». *Nature* 468 (7321): 232-43. <https://doi.org/10.1038/nature09613>.
- Bak, Lasse K., Arne Schousboe, et Helle S. Waagepetersen. 2006. « The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Aspects of Transport, Neurotransmitter Homeostasis and Ammonia Transfer ». *Journal of Neurochemistry* 98 (3): 641-53. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>.
- Barbagallo, Federica, Bing Xu, Gopireddy R. Reddy, Toni West, Qingtong Wang, Qin Fu, Minghui Li, et al. 2016. « Genetically Encoded Biosensors Reveal PKA Hyperphosphorylation on the Myofilaments in Rabbit Heart Failure ». *Circulation Research* 119 (8): 931-43. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308964>.
- Bartok, Adam, David Weaver, Tünde Golenár, Zuzana Nichtova, Máté Katona, Száva Bánsághi, Kamil J. Alzayady, et al. 2019. « IP 3 Receptor Isoforms Differently Regulate ER-Mitochondrial Contacts and Local Calcium Transfer ». *Nature Communications* 10 (1): 3726. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11646-3>.
- Basheer, Wassim, et Robin Shaw. 2016. « The “Tail” of Connexin43: An Unexpected Journey from Alternative Translation to Trafficking ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Cardiomyocyte Biology: Integration of Developmental and Environmental Cues in the Heart*, 1863 (7, Part B): 1848-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.015>.
- Begemann, Isabell, et Milos Galic. 2016. « Correlative Light Electron Microscopy: Connecting Synaptic Structure and Function ». *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 8: 28. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00028>.
- Belevich, Ilya, Merja Joensuu, Darshan Kumar, Helena Vihinen, et Eija Jokitalo. 2016. « Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets ». *PLOS Biology* 14 (1): e1002340. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002340>.
- Bellot-Saez, Alba, Orsolya Kékesi, John W. Morley, et Yossi Buskila. 2017. « Astrocytic Modulation of Neuronal Excitability through K<sup>+</sup> Spatial Buffering ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 77 (juin): 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002>.
- Benarroch, Eduardo E. 2018. « Glutamatergic Synaptic Plasticity and Dysfunction in Alzheimer Disease: Emerging Mechanisms ». *Neurology* 91 (3): 125-32. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005807>.

- Benfenati, Valentina, Marco Caprini, Melania Dovizio, Maria N. Mylonakou, Stefano Ferroni, Ole P. Ottersen, et Mahmood Amiry-Moghaddam. 2011. « An Aquaporin-4/Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) Complex Is Essential for Cell-Volume Control in Astrocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (6): 2563-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012867108>.
- Berg, Stuart, Dominik Kutra, Thorben Kroeger, Christoph N. Straehle, Bernhard X. Kausler, Carsten Haubold, Martin Schiegg, et al. 2019. « Ilastik: Interactive Machine Learning for (Bio)Image Analysis ». *Nature Methods*, septembre, 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9>.
- Bernardi, Paolo, et Sophia von Stockum. 2012. « The permeability transition pore as a Ca<sup>2+</sup> release channel: New answers to an old question ». *Cell Calcium* 52 (1): 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.03.004>.
- Bernardinelli, Yann, Dominique Muller, et Irina Nikonenko. 2014. « Astrocyte-Synapse Structural Plasticity ». *Neural Plasticity* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/232105>.
- Berridge, M. J. 1993. « Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling ». *Nature* 361 (6410): 315-25. <https://doi.org/10.1038/361315a0>.
- Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, et H. Llewelyn Roderick. 2003. « Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (7): 517-29. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>.
- Bindocci, Erika, Iaroslav Savtchouk, Nicolas Liaudet, Denise Becker, Giovanni Carriero, et Andrea Volterra. 2017. « Three-Dimensional Ca<sup>2+</sup> Imaging Advances Understanding of Astrocyte Biology ». *Science* 356 (6339): eaai8185. <https://doi.org/10.1126/science.aai8185>.
- Bishop, Derron, Ivana Nikić, Mary Brinkoetter, Sharmon Knecht, Stephanie Potz, Martin Kerschensteiner, et Thomas Misgeld. 2011. « Near-Infrared Branding Efficiently Correlates Light and Electron Microscopy ». *Nature Methods* 8 (7): 568-70. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1622>.
- Blanco-Suarez, Elena, Tong-Fei Liu, Alex Kopelevich, et Nicola J. Allen. 2018. « Astrocyte-Secreted Chordin-like 1 Drives Synapse Maturation and Limits Plasticity by Increasing Synaptic GluA2 AMPA Receptors ». *Neuron* 100 (5): 1116-1132.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.043>.
- Boitier, E., R. Rea, et M. R. Duchen. 1999. « Mitochondria Exert a Negative Feedback on the Propagation of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Waves in Rat Cortical Astrocytes ». *The Journal of Cell Biology* 145 (4): 795-808. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.795>.
- Borczyk, Malgorzata, Malgorzata Alicja Śliwińska, Anna Caly, Tytus Bernas, et Kasia Radwanska. 2019. « Neuronal Plasticity Affects Correlation between the Size of Dendritic Spine and Its Postsynaptic Density ». *Scientific Reports* 9 (1): 1693. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38412-7>.
- Bosanac, Ivan, Jean-René Alattia, Tapas K. Mal, Jenny Chan, Susanna Talarico, Frances K. Tong, Kit I. Tong, et al. 2002. « Structure of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Binding Core in Complex with Its Ligand ». *Nature* 420 (6916): 696-700. <https://doi.org/10.1038/nature01268>.
- Bosch, Carles, Albert Martínez, Nuria Masachs, Cátia M. Teixeira, Isabel Fernaud, Fausto Ulloa, Esther Pérez-Martínez, et al. 2015. « FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons ». *Frontiers in Neuroanatomy* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2015.00060>.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bosson, Anthony, Adrien Paumier, Sylvie Boisseau, Muriel Jacquier-Sarlin, Alain Buisson, et Mireille Albrieux. 2017. « TRPA1 Channels Promote Astrocytic Ca<sup>2+</sup> Hyperactivity and Synaptic Dysfunction Mediated by Oligomeric Forms of Amyloid- $\beta$  Peptide ». *Molecular Neurodegeneration* 12 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0194-8>.
- Bouzat, Pierre, Anne Millet, Yvonnick Boue, Karin Pernet-Gallay, Thibaut Trouve-Buisson, Lucie Gaide-Chevronnay, Emmanuel L. Barbier, et Jean-Francois Payen. 2013. « Changes in Brain Tissue Oxygenation after Treatment of Diffuse Traumatic Brain Injury by Erythropoietin ». *Critical Care Medicine* 41 (5): 1316-24. <https://doi.org/10.1097/CCM.obo13e31827ca64e>.
- Briggman, Kevin L., et Davi D. Bock. 2012. « Volume Electron Microscopy for Neuronal Circuit Reconstruction ». *Current Opinion in Neurobiology* 22 (1): 154-61. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.022>.
- Brown, Angus M., et Bruce R. Ransom. 2007. « Astrocyte Glycogen and Brain Energy Metabolism ». *Glia* 55 (12): 1263-71. <https://doi.org/10.1002/glia.20557>.
- Bushong, Eric A., Maryann E. Martone, et Mark H. Ellisman. 2003. « Examination of the Relationship between Astrocyte Morphology and Laminar Boundaries in the Molecular Layer of Adult Dentate Gyrus ». *Journal of Comparative Neurology* 462 (2): 241-51. <https://doi.org/10.1002/cne.10728>.
- Calì, Corrado, Jumana Baghabra, Daniya J. Boges, Glendon R. Holst, Anna Kreshuk, Fred A. Hamprecht, Madhusudhanan Srinivasan, Heikki Lehtälä, et Pierre J. Magistretti. 2016. « Three-dimensional immersive virtual reality for studying cellular compartments in 3D models from EM preparations of neural tissues ». *The Journal of Comparative Neurology* 524 (1): 23-38. <https://doi.org/10.1002/cne.23852>.
- Cardona, Albert, Stephan Saalfeld, Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Stephan Preibisch, Mark Longair, Pavel Tomancak, Volker Hartenstein, et Rodney J. Douglas. 2012. « TrakEM2 Software for Neural Circuit Reconstruction ». *PLOS ONE* 7 (6): e38011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038011>.
- Castejón, O. J. 1998. « Morphological Astrocytic Changes in Complicated Human Brain Trauma. A Light and Electron Microscopic Study ». *Brain Injury* 12 (5): 409-27; discussion 407. <https://doi.org/10.1080/026990598122539>.
- Castro, Maria Amalia Di, Julien Chuquet, Nicolas Liaudet, Khaleel Bhaukaurally, Mirko Santello, David Bouvier, Pascale Tiret, et Andrea Volterra. 2011. « Local Ca<sup>2+</sup> Detection and Modulation of Synaptic Release by Astrocytes ». *Nature Neuroscience* 14 (10): 1276-84. <https://doi.org/10.1038/nn.2929>.
- Chai, Hua, Blanca Diaz-Castro, Eiji Shigetomi, Emma Monte, J. Christopher O'Keefe, Xinzhu Yu, Whitaker Cohn, et al. 2017. « Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence ». *Neuron* 95 (3): 531-549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>.
- Chaudhry, F. A., K. P. Lehre, M. van Lookeren Campagne, O. P. Ottersen, N. C. Danbolt, et J. Storm-Mathisen. 1995. « Glutamate Transporters in Glial Plasma Membranes: Highly Differentiated Localizations Revealed by Quantitative Ultrastructural Immunocytochemistry ». *Neuron* 15 (3): 711-20. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90158-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90158-2).
- Chen, Naiyan, Hiroki Sugihara, Jitendra Sharma, Gertrudis Perea, Jeremy Petravic, Chuong Le, et Mriganka Sur. 2012. « Nucleus Basalis-Enabled Stimulus-Specific Plasticity in the Visual Cortex Is Mediated by Astrocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (41): E2832-2841. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206557109>.

- Chen, Tsai-Wen, Trevor J. Wardill, Yi Sun, Stefan R. Pulver, Sabine L. Renninger, Amy Baohan, Eric R. Schreiter, et al. 2013. « Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity ». *Nature* 499 (7458): 295-300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.
- Christopherson, Karen S., Erik M. Ullian, Caleb C. A. Stokes, Christine E. Mullowney, Johannes W. Hell, Azin Agah, Jack Lawler, Deane F. Mosher, Paul Bornstein, et Ben A. Barres. 2005. « Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins That Promote CNS Synaptogenesis ». *Cell* 120 (3): 421-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>.
- Chung, Won-Suk, Laura E. Clarke, Gordon X. Wang, Benjamin K. Stafford, Alexander Sher, Chandrani Chakraborty, Julia Joung, et al. 2013. « Astrocytes Mediate Synapse Elimination through MEGF10 and MERTK Pathways ». *Nature* 504 (7480): 394-400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>.
- Clarke, Laura E., Shane A. Liddelow, Chandrani Chakraborty, Alexandra E. Münch, Myriam Heiman, et Ben A. Barres. 2018. « Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (8): E1896-1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>.
- Contreras, Laura, Ilaria Drago, Enrico Zampese, et Tullio Pozzan. 2010. « Mitochondria: The Calcium Connection ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 16th European Bioenergetics Conference 2010, 1797 (6): 607-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.05.005>.
- Conway, Bruce R., et Keith T. Demarest. 2002. « The Use of Biosensors to Study GPCR Function: Applications for High-Content Screening ». *Receptors & Channels* 8 (5-6): 331-41.
- Cornell-Bell, A. H., et S. M. Finkbeiner. 1991. « Ca<sup>2+</sup> Waves in Astrocytes ». *Cell Calcium* 12 (2-3): 185-204. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(91\)90020-f](https://doi.org/10.1016/0143-4160(91)90020-f).
- Cornell-Bell, Ann H., Steven M. Finkbeiner, Mark S. Cooper, et Stephen J. Smith. 1990. « Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling ». *Science*, janvier. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>.
- Cragg, B. 1980. « Preservation of Extracellular Space during Fixation of the Brain for Electron Microscopy ». *Tissue & Cell* 12 (1): 63-72. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(80\)90052-x](https://doi.org/10.1016/0040-8166(80)90052-x).
- Dahl, R., et L. A. Staehelin. 1989. « High-Pressure Freezing for the Preservation of Biological Structure: Theory and Practice ». *Journal of Electron Microscopy Technique* 13 (3): 165-74. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060130305>.
- Decuyper, Jean-Paul, Giovanni Monaco, Geert Bultynck, Ludwig Missiaen, Humbert De Smedt, et Jan B. Parys. 2011. « The IP<sub>3</sub> Receptor–Mitochondria Connection in Apoptosis and Autophagy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Including the Special Section: 11th European Symposium on Calcium, 1813 (5): 1003-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.023>.
- Deemyad, Tara, Joel Lüthi, et Nelson Spruston. 2018. « Astrocytes Integrate and Drive Action Potential Firing in Inhibitory Subnetworks ». *Nature Communications* 9 (1): 4336. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06338-3>.
- Denizot, Audrey. 2019. « Simulation de la signalisation calcique dans les prolongements fins astrocytaires ». These de doctorat, Lyon. <https://www.theses.fr/2019LYSEI093>.
- Denk, Winfried, et Heinz Horstmann. 2004. « Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure ». *PLoS Biology* 2 (11): e329. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329>.

## BIBLIOGRAPHIE

- Doherty, Alison H., Cameron K. Ghalambor, et Seth W. Donahue. 2015. « Evolutionary Physiology of Bone: Bone Metabolism in Changing Environments ». *Physiology* 30 (1): 17-29. <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2014>.
- Dupont, Geneviève, Martin Falcke, Vivien Kirk, et James Sneyd. 2016. « Some Background Physiology ». In *Models of Calcium Signalling*, édité par Geneviève Dupont, Martin Falcke, Vivien Kirk, et James Sneyd, 3-27. Interdisciplinary Applied Mathematics. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-29647-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-29647-0_1).
- Emsley, Jason G., et Jeffrey D. Macklis. 2006. « Astroglial Heterogeneity Closely Reflects the Neuronal-Defined Anatomy of the Adult Murine CNS ». *Neuron Glia Biology* 2 (3): 175-86. <https://doi.org/10.1017/S1740925X06000202>.
- Erb, Laurie, et Gary A. Weisman. 2012. « Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways ». *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling* 1 (6): 789-803. <https://doi.org/10.1002/wmts.62>.
- Fiacco, Todd A., et Ken D. McCarthy. 2018. « Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions ». *The Journal of Neuroscience* 38 (1): 3-13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0016-17.2017>.
- Gavrilov, Nikolay, Inna Golyagina, Alexey Brazhe, Annalisa Scimemi, Vadim Turlapov, et Alexey Semyanov. 2018. « Astrocytic Coverage of Dendritic Spines, Dendritic Shafts, and Axonal Boutons in Hippocampal Neuropil ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (août). <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00248>.
- Giaume, Christian, Annette Koulakoff, Lisa Roux, David Holcman, et Nathalie Rouach. 2010. « Astroglial Networks: A Step Further in Neuroglial and Gliovascular Interactions ». *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (2): 87-99. <https://doi.org/10.1038/nrn2757>.
- Göbel, Jana, Elisa Motori, et Matteo Bergami. 2018. « Spatiotemporal Control of Mitochondrial Network Dynamics in Astroglial Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.191>.
- Göbel, Jana, Patric Pelzer, Esther Engelhardt, Vignesh Sakthivelu, Hannah M. Jahn, Milica Jevtic, Kat Folz-Donahue, et al. 2019. « Mitochondrial Fusion in Reactive Astrocytes Coordinates Local Metabolic Domains to Promote Vascular Repair ». *BioRxiv*, juin, 657999. <https://doi.org/10.1101/657999>.
- Göbel, Werner, Björn M Kampa, et Fritjof Helmchen. 2007. « Imaging Cellular Network Dynamics in Three Dimensions Using Fast 3D Laser Scanning ». *Nature Methods* 4 (1): 73-79. <https://doi.org/10.1038/nmeth989>.
- Goldberg, Martin W. 2008. « Immunolabeling for Scanning Electron Microscopy (SEM) and Field Emission SEM ». *Methods in Cell Biology* 88: 109-30. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)00407-X).
- Golgi, Camilio. 1870. « Sfoglia articolo: Intorno ai lavori del dott. C. Golgi in Pavia: sulla sostanza connettiva del cervello : comunicazione / 7 apr. 1870 - Rendiconti / Reale Istituto lombardo di scienze e lettere (1870 - 1870, Serie 2, Volume 3, nessun fascicolo) ». 7 avril 1870. [http://emeroteca.braidense.it/beic\\_attacc/sfoglia\\_articolo.php?IDTestata=908&CodScheda=000O&SearchString=rendiconti%20istituto&SearchField=titolo&PageRec=25&PageSel=1&PB=1&IDT=14&IDV=65&IDF=0&IDA=1808](http://emeroteca.braidense.it/beic_attacc/sfoglia_articolo.php?IDTestata=908&CodScheda=000O&SearchString=rendiconti%20istituto&SearchField=titolo&PageRec=25&PageSel=1&PB=1&IDT=14&IDV=65&IDF=0&IDA=1808).
- Golgi, Camillo. 1903. *Opera omnia*. Hoepli.
- Golovina, Vera A. 2005. « Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum ». *The Journal*

- of *Physiology* 564 (Pt 3): 737-49.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.085035>.
- Hajós, Ferenc, et Katalin Halasy. 1998. « Pre- or Postembedding Immunocytochemistry: Which to Choose for the Localization of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)? » *Journal of Neuroscience Methods* 85 (1): 99-105.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(98\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(98)00124-1).
- Haj-Yasein, Nadia Nabil, Vidar Jensen, Ivar Østby, Stig W. Omholt, Juha Voipio, Kai Kaila, Ole P. Ottersen, Øivind Hvalby, et Erlend A. Nagelhus. 2012. « Aquaporin-4 Regulates Extracellular Space Volume Dynamics during High-Frequency Synaptic Stimulation: A Gene Deletion Study in Mouse Hippocampus ». *Glia* 60 (6): 867-74. <https://doi.org/10.1002/glia.22319>.
- Halassa, Michael M., Tommaso Fellin, Hajime Takano, Jing-Hui Dong, et Philip G. Haydon. 2007. « Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte ». *Journal of Neuroscience* 27 (24): 6473-77.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007>.
- Harada, Kazuki, Taichi Kamiya, et Takashi Tsuboi. 2016. « Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental and pathological implications in the brain ». *Frontiers in Neuroscience* 9.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2015.00499>.
- Harris, Charles R., K. Jarrod Millman, Stéfan J. van der Walt, Ralf Gommers, Pauli Virtanen, David Cournapeau, Eric Wieser, et al. 2020. « Array Programming with NumPy ». *Nature* 585 (7825): 357-62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>.
- Harris, J. Robin. 2015. « Transmission Electron Microscopy in Molecular Structural Biology: A Historical Survey ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 581 (septembre): 3-18. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.011>.
- Harris, Kristen M., et Richard J. Weinberg. 2012. « Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (5): a005587. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005587>.
- Haustein, Martin D., Sebastian Kracun, Xiao-Hong Lu, Tiffany Shih, Olan Jackson-Weaver, Xiaoping Tong, Ji Xu, et al. 2014. « Conditions and Constraints for Astrocyte Calcium Signaling in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway ». *Neuron* 82 (2): 413-29. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.041>.
- Hayworth, Kenneth J, C Shan Xu, Zhiyuan Lu, Graham W Knott, Richard D Fetter, Juan Carlos Tapia, Jeff W Lichtman, et Harald F Hess. 2015. « Ultrastructurally Smooth Thick Partitioning and Volume Stitching for Large-Scale Connectomics ». *Nature Methods* 12 (4): 319-22.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3292>.
- Helmstaedter, Moritz, Kevin L. Briggman, et Winfried Denk. 2008. « 3D Structural Imaging of the Brain with Photons and Electrons ». *Current Opinion in Neurobiology* 18 (6): 633-41. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.03.005>.
- Henderson, Mark J., Heather A. Baldwin, Christopher A. Werley, Stefano Boccardo, Leslie R. Whitaker, Xiaokang Yan, Graham T. Holt, et al. 2015. « A Low Affinity GCaMP3 Variant (GCaMPer) for Imaging the Endoplasmic Reticulum Calcium Store ». *PLOS ONE* 10 (10): e0139273.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139273>.
- Henneberger, Christian, Thomas Papouin, Stéphane H. R. Oliet, et Dmitri A. Rusakov. 2010. « Long term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes ». *Nature* 463 (7278): 232-36.  
<https://doi.org/10.1038/nature08673>.

## BIBLIOGRAPHIE

- Herculano-Houzel, Suzana. 2009. « The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain ». *Frontiers in Human Neuroscience* 3 (novembre): 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>.
- Hertle, D. N., et M. F. Yeckel. 2007. « Distribution of Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor Isoforms and Ryanodine Receptor Isoforms during Maturation of the Rat Hippocampus ». *Neuroscience* 150 (3): 625-38. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.058>.
- Hertz, Leif, et Ye Chen. 2016. « Importance of Astrocytes for Potassium Ion (K<sup>+</sup>) Homeostasis in Brain and Glial Effects of K<sup>+</sup> and Its Transporters on Learning ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 71 (décembre): 484-505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.018>.
- Heymann, Jurgen A. W., Mike Hayles, Ingo Gestmann, Lucille A. Giannuzzi, Ben Lich, et Sriram Subramaniam. 2006. « Site-Specific 3D Imaging of Cells and Tissues with a Dual Beam Microscope ». *Journal of Structural Biology* 155 (1): 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.03.006>.
- Hirase, Hajime, Lifan Qian, Peter Barthó, et György Buzsáki. 2004. « Calcium Dynamics of Cortical Astrocytic Networks In Vivo ». *PLOS Biology* 2 (4): e96. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020096>.
- Holtzman, Lynne A., Siddhesh Pandhit, Dan J. Bare, Gregory A. Mignery, et James T. Russell. 2002. « Astrocytes in Adult Rat Brain Express Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors ». *Glia* 39 (1): 69-84. <https://doi.org/10.1002/glia.10085>.
- Honsek, Silke D., Corinna Walz, Karl W. Kafitz, et Christine R. Rose. 2012. « Astrocyte Calcium Signals at Schaffer Collateral to CA1 Pyramidal Cell Synapses Correlate with the Number of Activated Synapses but Not with Synaptic Strength ». *Hippocampus* 22 (1): 29-42. <https://doi.org/10.1002/hipo.20843>.
- Iadecola, Costantino, et Maiken Nedergaard. 2007. « Glial Regulation of the Cerebral Microvasculature ». *Nature Neuroscience* 10 (11): 1369-76. <https://doi.org/10.1038/nn2003>.
- Jackson, Joshua G., et Michael B. Robinson. 2015. « Reciprocal Regulation of Mitochondrial Dynamics and Calcium Signaling in Astrocyte Processes ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (45): 15199-213. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2049-15.2015>.
- . 2018. « Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: mechanisms, consequences, and unknowns ». *Glia* 66 (6): 1213-34. <https://doi.org/10.1002/glia.23252>.
- Jacobson, Jake, et Michael R. Duchen. 2004. « Interplay between Mitochondria and Cellular Calcium Signalling ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 256-257 (1-2): 209-18. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009869.29827.df>.
- Jones, Jonathan C. R. 2016. « Pre- and Post-Embedding Immunogold Labeling of Tissue Sections ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1474: 291-307. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2_19).
- Jorstad, Anne, Biagio Nigro, Corrado Cali, Marta Wawrzyniak, Pascal Fua, et Graham Knott. 2015. « NeuroMorph: A Toolset for the Morphometric Analysis and Visualization of 3D Models Derived from Electron Microscopy Image Stacks ». *Neuroinformatics* 13: 83. <https://doi.org/10.1007/s12021-014-9242-5>.
- Jourdain, Pascal, Linda H Bergersen, Khaleel Bhaukaurally, Paola Bezzi, Mirko Santello, Maria Domercq, Carlos Matute, Fiorella Tonello, Vidar Gundersen, et Andrea Volterra. 2007. « Glutamate Exocytosis from Astrocytes Controls Synaptic Strength ». *Nature Neuroscience* 10 (3): 331-39. <https://doi.org/10.1038/nn1849>.

- Kann, M. -L., et J. -P. Fouquet. 1989. « Comparison of LR White Resin, Lowicryl K4M and Epon Postembedding Procedures for Immunogold Staining of Actin in the Testis ». *Histochemistry* 91 (3): 221-26. <https://doi.org/10.1007/BF00490136>.
- Kano, Masanobu, Takako Ohno-Shosaku, Yuki Hashimoto-dani, Motokazu Uchigashima, et Masahiko Watanabe. 2009. « Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission ». *Physiological Reviews* 89 (1): 309-80. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>.
- Kasai, H., et O. H. Petersen. 1994. « Spatial Dynamics of Second Messengers: IP<sub>3</sub> and CAMP as Long-Range and Associative Messengers ». *Trends in Neurosciences* 17 (3): 95-101. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90112-0).
- Kellner, Vered, Calvin J. Kersbergen, Sally Li, Travis A. Babola, Gesine Saher, et Dwight E. Bergles. 2021. « Dual Metabotropic Glutamate Receptor Signaling Enables Coordination of Astrocyte and Neuron Activity in Developing Sensory Domains ». *Neuron* 109 (16): 2545-2555.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.010>.
- Khakh, Baljit S., et R. Alan North. 2012. « Neuromodulation by extracellular ATP and P<sub>2</sub>X receptors in the CNS ». *Neuron* 76 (1): 51-69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>.
- Khakh, Baljit S, et Michael V Sofroniew. 2015. « Diversity of Astrocyte Functions and Phenotypes in Neural Circuits ». *Nature Neuroscience* 18 (7): 942-52. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>.
- Kikuchi, Toko, Juncal Gonzalez-Soriano, Asta Kastanauskaite, Ruth Benavides-Piccione, Angel Merchan-Perez, Javier DeFelipe, et Lidia Blazquez-Llorca. 2020. « Volume Electron Microscopy Study of the Relationship Between Synapses and Astrocytes in the Developing Rat Somatosensory Cortex ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 30 (6): 3800-3819. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz343>.
- Kim, Eunjin, Jiyoung Lee, Seulgi Noh, Ohkyung Kwon, et Ji Young Mun. 2020. « Double Staining Method for Array Tomography Using Scanning Electron Microscopy ». *Applied Microscopy* 50 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/s42649-020-00033-8>.
- Kiyoshi, Conrad M., Sydney Aten, Emily P. Arzola, Jeremy A. Patterson, Anne T. Taylor, Yixing Du, Ally M. Guiher, et al. 2020. « Ultrastructural View of Astrocyte-Astrocyte and Astrocyte-Synapse Contacts within the Hippocampus ». <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.358200>.
- Knott, Graham, Herschel Marchman, David Wall, et Ben Lich. 2008. « Serial Section Scanning Electron Microscopy of Adult Brain Tissue Using Focused Ion Beam Milling ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (12): 2959-64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008>.
- Knott, Graham W., Anthony Holtmaat, Linda Wilbrecht, Egbert Welker, et Karel Svoboda. 2006. « Spine Growth Precedes Synapse Formation in the Adult Neocortex in Vivo ». *Nature Neuroscience* 9 (9): 1117-24. <https://doi.org/10.1038/nn1747>.
- Kolenicova, Denisa, Jana Tureckova, Barbora Pukajova, Lenka Harantova, Jan Kriska, Denisa Kirdajova, Ivan Vorisek, et al. 2020. « High Potassium Exposure Reveals the Altered Ability of Astrocytes to Regulate Their Volume in the Aged Hippocampus of GFAP/EGFP Mice ». *Neurobiology of Aging* 86 (février): 162-81. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.009>.

- Korogod, Natalya, Carl CH Petersen, et Graham W Knott. 2015. « Ultrastructural Analysis of Adult Mouse Neocortex Comparing Aldehyde Perfusion with Cryo Fixation ». *ELife* 4 (août). <https://doi.org/10.7554/eLife.05793>.
- Kremer, J. R., D. N. Mastronarde, et J. R. McIntosh. 1996. « Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD ». *Journal of Structural Biology* 116 (1): 71-76. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0013>.
- Krols, Michiel, Gert van Isterdael, Bob Asselbergh, Anna Kremer, Saskia Lippens, Vincent Timmerman, et Sophie Janssens. 2016. « Mitochondria-Associated Membranes as Hubs for Neurodegeneration ». *Acta Neuropathologica* 131 (4): 505-23. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1528-7>.
- Kuan, Aaron T., Jasper S. Phelps, Logan A. Thomas, Tri M. Nguyen, Julie Han, Chiao-Lin Chen, Anthony W. Azevedo, et al. 2020. « Dense Neuronal Reconstruction through X-Ray Holographic Nano-Tomography ». *Nature Neuroscience* 23 (12): 1637-43. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0704-9>.
- Kuga, Nahoko, Takuya Sasaki, Yuji Takahara, Norio Matsuki, et Yuji Ikegaya. 2011. « Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo ». *Journal of Neuroscience* 31 (7): 2607-14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5319-10.2011>.
- Kukulski, Wanda, Martin Schorb, Sonja Welsch, Andrea Picco, Marko Kaksonen, et John A. G. Briggs. 2012. « Precise, Correlated Fluorescence Microscopy and Electron Tomography of Lowicryl Sections Using Fluorescent Fiducial Markers ». *Methods in Cell Biology* 111: 235-57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416026-2.00013-3>.
- Laissue, P. Philippe, Rana A. Alghamdi, Pavel Tomancak, Emmanuel G. Reynaud, et Hari Shroff. 2017. « Assessing Phototoxicity in Live Fluorescence Imaging ». *Nature Methods* 14 (7): 657-61. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4344>.
- Lavialle, Monique, Georg Aumann, Enrico Anlauf, Felicitas Pröls, Monique Arpin, et Amin Derouiche. 2011. « Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (31): 12915-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100957108>.
- Lees, Robert M., Christopher J. Peddie, Lucy M. Collinson, Michael C. Ashby, et Paul Verkade. 2017. « Correlative Two-Photon and Serial Block Face Scanning Electron Microscopy in Neuronal Tissue Using 3D near-Infrared Branding Maps ». *Methods in Cell Biology* 140: 245-76. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.03.007>.
- Legland, David, Ignacio Arganda-Carreras, et Philippe Andrey. 2016. « MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ ». *Bioinformatics* 32 (22): 3532-34. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw413>.
- Lenhossék, Mihály. 1893. *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen*. Fischer.
- Li, Hailong, Xiaowan Wang, Nannan Zhang, Manoj K. Gottipati, Vladimir Parpura, et Shinghua Ding. 2014. « Imaging of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Dynamics in Astrocytes Using Cell-Specific Mitochondria-Targeted GCaMP5G/6s: Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake and Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Availability via the Endoplasmic Reticulum Store ». *Cell Calcium* 56 (6): 457-66. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.008>.
- Li, Lun, Cigdem Acioglu, Robert F. Heary, et Stella Elkabes. 2021. « Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases ». *Brain, Behavior, and Immunity* 91 (janvier): 740-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.007>.

- Li, Xiaoyu, Jiajun Lv, Jiazhi Li, et Xiang Ren. 2021. « Kir4.1 may represent a novel therapeutic target for diabetic retinopathy (Review) ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 22 (3): 1021. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10453>.
- Lia, Annamaria, Vanessa Jorge Henriques, Micaela Zonta, Angela Chiavegato, Giorgio Carmignoto, Marta Gómez-Gonzalo, et Gabriele Losi. 2021. « Calcium Signals in Astrocyte Microdomains, a Decade of Great Advances ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2021.673433>.
- Linnerbauer, Mathias, Michael A. Wheeler, et Francisco J. Quintana. 2020. « Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation ». *Neuron* 108 (4): 608-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>.
- Loussert Fonta, Celine, Andrew Leis, Cliff Mathisen, David S. Bouvier, Willy Blanchard, Andrea Volterra, Ben Lich, et Bruno M. Humbel. 2015. « Analysis of Acute Brain Slices by Electron Microscopy: A Correlative Light–Electron Microscopy Workflow Based on Tokuyasu Cryo-Sectioning ». *Journal of Structural Biology* 189 (1): 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.10.011>.
- Lovatt, Ditte, Ursula Sonnewald, Helle S. Waagepetersen, Arne Schousboe, Wei He, Jane H.-C. Lin, Xiaoning Han, et al. 2007. « The Transcriptome and Metabolic Gene Signature of Protoplasmic Astrocytes in the Adult Murine Cortex ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (45): 12255-66. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007>.
- Magistretti, Pierre J., Luc Pellerin, Douglas L. Rothman, et Robert G. Shulman. 1999. « Energy on Demand ». *Science*, janvier. <https://doi.org/10.1126/science.283.5401.496>.
- Mannari, Tetsuya, Shoko Morita, Eriko Furube, Makoto Tominaga, et Seiji Miyata. 2013. « Astrocytic TRPV1 Ion Channels Detect Blood-Borne Signals in the Sensory Circumventricular Organs of Adult Mouse Brains ». *Glia* 61 (6): 957-71. <https://doi.org/10.1002/glia.22488>.
- Marchi, Saverio, et Paolo Pinton. 2014. « The Mitochondrial Calcium Uniporter Complex: Molecular Components, Structure and Physiopathological Implications ». *The Journal of Physiology* 592 (5): 829-39. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268235>.
- Marina, Nephtali, Egor Turovsky, Isabel N. Christie, Patrick S. Hosford, Anna Hadjihambi, Alla Korsak, Richard Ang, et al. 2018. « Brain Metabolic Sensing and Metabolic Signaling at the Level of an Astrocyte ». *Glia* 66 (6): 1185-99. <https://doi.org/10.1002/glia.23283>.
- Martin, D. L. 1992. « Synthesis and Release of Neuroactive Substances by Glial Cells ». *Glia* 5 (2): 81-94. <https://doi.org/10.1002/glia.440050202>.
- Mathiisen, Thomas Misje, Knut Petter Lehre, Niels Christian Danbolt, et Ole Petter Ottersen. 2010. « The Perivascular Astroglial Sheath Provides a Complete Covering of the Brain Microvessels: An Electron Microscopic 3D Reconstruction ». *Glia* 58 (9): 1094-1103. <https://doi.org/10.1002/glia.20990>.
- Matsui, Ko, Craig E. Jahr, et Maria E. Rubio. 2005. « High-Concentration Rapid Transients of Glutamate Mediate Neural-Glial Communication via Ectopic Release ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (33): 7538-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1927-05.2005>.
- Mazaré, Noémie, Marc Oudart, Julien Moulard, Giselle Cheung, Romain Tortuyaux, Philippe Maily, David Mazaud, et al. 2020. « Local Translation in Perisynaptic Astrocytic Processes Is Specific and Changes after Fear Conditioning ». *Cell Reports* 32 (8): 108076. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108076>.

## BIBLIOGRAPHIE

- McDonald, K. 1999. « High-Pressure Freezing for Preservation of High Resolution Fine Structure and Antigenicity for Immunolabeling ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 117: 77-97. <https://doi.org/10.1385/1-59259-201-5:77>.
- McDougal, David H., Gerlinda E. Hermann, et Richard C. Rogers. 2011. « Vagal Afferent Stimulation Activates Astrocytes in the Nucleus of the Solitary Tract Via AMPA Receptors: Evidence of an Atypical Neural–Glial Interaction in the Brainstem ». *Journal of Neuroscience* 31 (39): 14037-45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2855-11.2011>.
- Mikoshiba, Katsuhiko. 2007. « The IP<sub>3</sub> Receptor/Ca<sup>2+</sup> Channel and Its Cellular Function ». *Biochemical Society Symposium*, n° 74: 9-22. <https://doi.org/10.1042/BSS0740009>.
- Milne, Jacqueline L. S., Mario J. Borgnia, Alberto Bartesaghi, Erin E. H. Tran, Lesley A. Earl, David M. Schauder, Jeffrey Lengyel, Jason Pierson, Ardan Patwardhan, et Sriram Subramaniam. 2013. « Cryo-Electron Microscopy--a Primer for the Non-Microscopist ». *The FEBS Journal* 280 (1): 28-45. <https://doi.org/10.1111/febs.12078>.
- Mishima, Tsuneko, et Hajime Hirase. 2010. « In Vivo Intracellular Recording Suggests That Gray Matter Astrocytes in Mature Cerebral Cortex and Hippocampus Are Electrophysiologically Homogeneous ». *The Journal of Neuroscience* 30 (8): 3093-3100. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5065-09.2010>.
- Möbius, Wiebke, Benjamin Cooper, Walter A. Kaufmann, Cordelia Imig, Torben Ruhwedel, Nicolas Snaidero, Aiman S. Saab, et Frédérique Varoqueaux. 2010a. « Electron Microscopy of the Mouse Central Nervous System ». *Methods in Cell Biology* 96: 475-512. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96020-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96020-2).
- . 2010b. « Electron Microscopy of the Mouse Central Nervous System ». *Methods in Cell Biology* 96: 475-512. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96020-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96020-2).
- Möbius, Wiebke, et George Posthuma. 2019. « Sugar and Ice: Immunoelectron Microscopy Using Cryosections According to the Tokuyasu Method ». *Tissue & Cell* 57 (avril): 90-102. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.08.010>.
- Morgello, S., R. R. Uson, E. J. Schwartz, et R. S. Haber. 1995. « The Human Blood-Brain Barrier Glucose Transporter (GLUT1) Is a Glucose Transporter of Gray Matter Astrocytes ». *Glia* 14 (1): 43-54. <https://doi.org/10.1002/glia.440140107>.
- Motori, Elisa, Julien Puyal, Nicolas Toni, Alexander Ghanem, Cristina Angeloni, Marco Malaguti, Giorgio Cantelli-Forti, et al. 2013. « Inflammation-Induced Alteration of Astrocyte Mitochondrial Dynamics Requires Autophagy for Mitochondrial Network Maintenance ». *Cell Metabolism* 18 (6): 844-59. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.005>.
- Mukherjee, Konark, Helen R. Clark, Vrushali Chavan, Emily K. Benson, Grahame J. Kidd, et Sarika Srivastava. 2016. « Analysis of Brain Mitochondria Using Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n° 113 (juillet): 54214. <https://doi.org/10.3791/54214>.
- Murai, Keith K., Louis N. Nguyen, Fumitoshi Irie, Yu Yamaguchi, et Elena B. Pasquale. 2003. « Control of Hippocampal Dendritic Spine Morphology through Ephrin-A3/EphA4 Signaling ». *Nature Neuroscience* 6 (2): 153-60. <https://doi.org/10.1038/nn994>.
- Nag, Sukriti. 2011. « Morphology and Properties of Brain Endothelial Cells ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 686: 3-47. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_1).

- Nagelhus, Erlend A., et Ole P. Ottersen. 2013. « Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain ». *Physiological Reviews* 93 (4): 1543-62. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>.
- Nägerl, U. Valentin, German Köstinger, John C. Anderson, Kevan A. C. Martin, et Tobias Bonhoeffer. 2007. « Protracted Synaptogenesis after Activity-Dependent Spinogenesis in Hippocampal Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (30): 8149-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-07.2007>.
- Nahirney, Patrick C., et Marie-Eve Tremblay. 2021. « Brain Ultrastructure: Putting the Pieces Together ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 187. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.629503>.
- Navarrete, Marta, et Alfonso Araque. 2008. « Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication ». *Neuron* 57 (6): 883-93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.029>.
- . 2010. « Endocannabinoids Potentiate Synaptic Transmission through Stimulation of Astrocytes ». *Neuron* 68 (1): 113-26. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.043>.
- . 2014. « The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8 (mai): 33. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00033>.
- Navarrete, Marta, Adolfo Díez, et Alfonso Araque. 2014. « Astrocytes in endocannabinoid signalling ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1654): 20130599. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0599>.
- Newman, E. A., et K. R. Zahs. 1997. « Calcium Waves in Retinal Glial Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 275 (5301): 844-47. <https://doi.org/10.1126/science.275.5301.844>.
- Nishida, Hideko, et Shigeo Okabe. 2007. « Direct Astrocytic Contacts Regulate Local Maturation of Dendritic Spines ». *The Journal of Neuroscience* 27 (2): 331-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4466-06.2007>.
- Niswender, Colleen M., et P. Jeffrey Conn. 2010. « Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease ». *Annual review of pharmacology and toxicology* 50: 295-322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>.
- Norenberg, M. D., et A. Martinez-Hernandez. 1979. « Fine Structural Localization of Glutamine Synthetase in Astrocytes of Rat Brain ». *Brain Research* 161 (2): 303-10. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90071-4).
- Oberheim, Nancy Ann, Steven A. Goldman, et Maiken Nedergaard. 2012. « Heterogeneity of Astrocytic Form and Function ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 814: 23-45. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3).
- O'Donnell, John C., Joshua G. Jackson, et Michael B. Robinson. 2016. « Transient Oxygen/Glucose Deprivation Causes a Delayed Loss of Mitochondria and Increases Spontaneous Calcium Signaling in Astrocytic Processes ». *The Journal of Neuroscience* 36 (27): 7109-27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4518-15.2016>.
- Ohno-Shosaku, Takako, Asami Tanimura, Yuki Hashimoto, et Masanobu Kano. 2012. « Endocannabinoids and Retrograde Modulation of Synaptic Transmission ». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 18 (2): 119-32. <https://doi.org/10.1177/1073858410397377>.

## BIBLIOGRAPHIE

- Okubo, Yohei. 2020. « Astrocytic Ca<sup>2+</sup> Signaling Mediated by the Endoplasmic Reticulum in Health and Disease ». *Journal of Pharmacological Sciences* 144 (2): 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.07.006>.
- Okubo, Yohei, Kazunori Kanemaru, Junji Suzuki, Kenta Kobayashi, Kenzo Hirose, et Masamitsu Iino. 2019. « Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 2-Independent Ca<sup>2+</sup> Release from the Endoplasmic Reticulum in Astrocytes ». *Glia* 67 (1): 113-24. <https://doi.org/10.1002/glia.23531>.
- Palty, Raz, Michal Hershfinkel, et Israel Sekler. 2012. « Molecular Identity and Functional Properties of the Mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger \* ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (38): 31650-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.355867>.
- Palygin, Oleg, Ulyana Lalo, Alexei Verkhratsky, et Yuriy Pankratov. 2010. « Iontropic NMDA and P2X<sub>1/5</sub> Receptors Mediate Synaptically Induced Ca<sup>2+</sup> Signalling in Cortical Astrocytes ». *Cell Calcium* 48 (4): 225-31. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.004>.
- Panatier, Aude, Joanne Vallée, Michael Haber, Keith K. Murai, Jean-Claude Lacaille, et Richard Robitaille. 2011a. « Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses ». *Cell* 146 (5): 785-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>.
- . 2011b. « Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses ». *Cell* 146 (5): 785-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>.
- Pannasch, Ulrike, et Nathalie Rouach. 2013. « Emerging Role for Astroglial Networks in Information Processing: From Synapse to Behavior ». *Trends in Neurosciences* 36 (7): 405-17. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>.
- Patrushev, Ilya, Nikolay Gavrilov, Vadim Turlapov, et Alexey Semyanov. 2013. « Subcellular Location of Astrocytic Calcium Stores Favors Extrasynaptic Neuron–Astrocyte Communication ». *Cell Calcium* 54 (5): 343-49. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.08.003>.
- Paumier, Adrien, Sylvie Boisseau, Muriel Jacquier-Sarlin, Karin Pernet-Gallay, Alain Buisson, et Mireille Albrieux. 2021. « Astrocyte-Neuron Interplay Is Critical for Alzheimer’s Disease Pathogenesis and Is Rescued by TRPA<sub>1</sub> Channel Blockade ». *Brain: A Journal of Neurology*, juillet, awab281. <https://doi.org/10.1093/brain/awab281>.
- Pellerin, L., et P. J. Magistretti. 1994. « Glutamate Uptake into Astrocytes Stimulates Aerobic Glycolysis: A Mechanism Coupling Neuronal Activity to Glucose Utilization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22): 10625-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>.
- Peters, A., et I. R. Kaiserman-Abramof. 1970. « The Small Pyramidal Neuron of the Rat Cerebral Cortex. The Perikaryon, Dendrites and Spines ». *The American Journal of Anatomy* 127 (4): 321-55. <https://doi.org/10.1002/aja.1001270402>.
- Peters, Alan, Sanford L. Palay, et Henry deF Webster. 1991. *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells*. 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- Petravicz, Jeremy, Todd A. Fiacco, et Ken D. McCarthy. 2008. « Loss of IP<sub>3</sub> Receptor-Dependent Ca<sup>2+</sup> Increases in Hippocampal Astrocytes Does Not Affect Baseline CA<sub>1</sub> Pyramidal Neuron Synaptic Activity ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (19): 4967-73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5572-07.2008>.

- Pfriegeer, Frank W., et Barbara A. Barres. 1997. « Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro ». *Science*, septembre. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1684>.
- Phend, K, Aldo Rustioni, et Richard Weinberg. 1995. « An osmium-free method of Epon embedment that preserves both ultrastructure and antigenicity for post-embedding immunocytochemistry ». *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 43 (avril): 283-92. <https://doi.org/10.1177/43.3.7532656>.
- Piet, Richard, Lydia Vargová, Eva Syková, Dominique A. Poulain, et Stéphane H. R. Oliet. 2004. « Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7): 2151-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308408100>.
- Pinheiro, Paulo, et Christophe Mulle. 2006. « Kainate Receptors ». *Cell and Tissue Research* 326 (2): 457-82. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0265-6>.
- Piomelli, Daniele. 2003. « The Molecular Logic of Endocannabinoid Signalling ». *Nature Reviews. Neuroscience* 4 (11): 873-84. <https://doi.org/10.1038/nrn1247>.
- Popov, V.I., H.A. Davies, V.V. Rogachevsky, I.V. Patrushev, M.L. Errington, P.L.A. Gabbott, T.V.P. Bliss, et M.G. Stewart. 2004. « Remodelling of Synaptic Morphology but Unchanged Synaptic Density during Late Phase Long-Term Potentiation(Ltp): A Serial Section Electron Micrograph Study in the Dentate Gyrus in the Anaesthetised Rat ». *Neuroscience* 128 (2): 251-62. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.029>.
- Prakriya, Murali, et Richard S. Lewis. 2015. « Store-Operated Calcium Channels ». *Physiological Reviews* 95 (4): 1383-1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>.
- Prudovsky, Igor, Francesca Tarantini, Matteo Landriscina, David Neivandt, Raffaella Sold, Aleksandr Kirov, Deena Small, Karuppanan Muthusamy Kathir, Dakshinamurthy Rajalingam, et Thallapuram Krishnaswamy Suresh Kumar. 2008. « Secretion Without Golgi ». *Journal of cellular biochemistry* 103 (5): 1327-43. <https://doi.org/10.1002/jcb.21513>.
- Qian, Youcun, Caini Liu, Justin Hartupee, Cengiz Zubeyir Altuntas, Muhammet Fatih Gulen, Daniel Jane-wit, Jianhua Xiao, et al. 2007. « The Adaptor Act1 Is Required for Interleukin 17–Dependent Signaling Associated with Autoimmune and Inflammatory Disease ». *Nature Immunology* 8 (3): 247-56. <https://doi.org/10.1038/ni1439>.
- Quincozes-Santos, André, Camila Leite Santos, Rômulo Rodrigo de Souza Almeida, Amanda da Silva, Natalie K. Thomaz, Naithan Ludian Fernandes Costa, Fernanda Becker Weber, et al. 2021. « Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells ». *Molecular Neurobiology*, septembre, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02574-9>.
- Raunser, Stefan. 2017. « Cryo-EM Revolutionizes the Structure Determination of Biomolecules ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 56 (52): 16450-52. <https://doi.org/10.1002/anie.201710679>.
- Reichenbach, Andreas, Amin Derouiche, et Frank Kirchhoff. 2010. « Morphology and Dynamics of Perisynaptic Glia ». *Brain Research Reviews* 63 (1-2): 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.003>.
- Rohmann, Astrid, et J. R. Wolff. 1996. « Subcellular Topography and Plasticity of Gap Junction Distribution on Astrocytes ». In *Gap Junctions in the Nervous System*, édité par David C. Spray et Rolf Dermietzel, 175-92. Neuroscience Intelligence

- Unit. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-21935-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-21935-5_10).
- Rose, C. R., et A. Konnerth. 2001. « Stores Not Just for Storage. Intracellular Calcium Release and Synaptic Plasticity ». *Neuron* 31 (4): 519-22. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00402-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00402-0).
- Rose, Christine R., Lisa Felix, Andre Zeug, Dirk Dietrich, Andreas Reiner, et Christian Henneberger. 2018. « Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (janvier): 451. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00451>.
- Rostaing, Philippe, Eleonore Real, Léa Siksou, Jean-Pierre Lechaire, Thomas Boudier, Tobias M. Boeckers, Frank Gertler, Eckart D. Gundelfinger, Antoine Triller, et Serge Marty. 2006. « Analysis of Synaptic Ultrastructure without Fixative Using High-Pressure Freezing and Tomography ». *The European Journal of Neuroscience* 24 (12): 3463-74. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05234.x>.
- Rothman, Douglas L., Henk M. De Feyter, Robin A. de Graaf, Graeme F. Mason, et Kevin L. Behar. 2011. « <sup>13</sup>C MRS Studies of Neuroenergetics and Neurotransmitter Cycling in Humans ». *NMR in Biomedicine* 24 (8): 943-57. <https://doi.org/10.1002/nbm.1772>.
- Rusakov, Dmitri A. 2015. « Disentangling Calcium-Driven Astrocyte Physiology ». *Nature Reviews Neuroscience* 16 (4): 226-33. <https://doi.org/10.1038/nrn3878>.
- Sakers, Kristina, Allison M. Lake, Rohan Khazanchi, Rebecca Ouwenga, Michael J. Vasek, Adish Dani, et Joseph D. Dougherty. 2017. « Astrocytes Locally Translate Transcripts in Their Peripheral Processes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (19): E3830-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617782114>.
- Santello, Mirko, Nicolas Toni, et Andrea Volterra. 2019a. « Astrocyte Function from Information Processing to Cognition and Cognitive Impairment ». *Nature Neuroscience*, janvier. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8>.
- . 2019b. « Astrocyte Function from Information Processing to Cognition and Cognitive Impairment ». *Nature Neuroscience* 22 (2): 154-66. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8>.
- Scharfman, Helen E. 2011. *The Dentate Gyrus: A Comprehensive Guide to Structure, Function, and Clinical Implications*. Elsevier.
- Scheffer, Louis K., C. Shan Xu, Michal Januszewski, Zhiyuan Lu, Shin-Ya Takemura, Kenneth J. Hayworth, Gary B. Huang, et al. 2020. « A Connectome and Analysis of the Adult Drosophila Central Brain ». *ELife* 9 (septembre): e57443. <https://doi.org/10.7554/eLife.57443>.
- Schertel, Andreas, Nicolas Snaidero, Hong-Mei Han, Torben Ruhwedel, Michael Laue, Markus Grabenbauer, et Wiebke Möbius. 2013. « Cryo FIB-SEM: Volume Imaging of Cellular Ultrastructure in Native Frozen Specimens ». *Journal of Structural Biology* 184 (2): 355-60. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.09.024>.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. « Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis ». *Nature Methods* 9 (7): 676-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Schipke, Carola G., Clemens Boucsein, Carsten Ohlemeyer, Frank Kirchhoff, et Helmut Kettenmann. 2002. « Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Waves Trigger Responses in Microglial Cells in Brain Slices ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation*

- of American Societies for Experimental Biology* 16 (2): 255-57.  
<https://doi.org/10.1096/fj.01-0514fje>.
- Schultz, R. L., E. A. Maynard, et D. C. Pease. 1957. « Electron Microscopy of Neurons and Neuroglia of Cerebral Cortex and Corpus Callosum ». *The American Journal of Anatomy* 100 (3): 369-407.  
<https://doi.org/10.1002/aja.1001000305>.
- Semyanov, Alexey, et Alexei Verkhatsky. 2021. « Astrocytic Processes: From Tripartite Synapses to the Active Milieu ». *Trends in Neurosciences* 44 (10): 781-92. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.07.006>.
- Serrat, Roman, Ana Covelo, Cladimir Kouskoff, Sebastien Delcasso, Andrea Ruiz, Nicolas Chenouard, Carol Stella, et al. 2020. « Astroglial calcium transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria determines synaptic integration | bioRxiv ». 12 août 2020.  
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.08.415620v1>.
- Shah, Furqan A., Krisztina Ruscsák, et Anders Palmquist. 2019. « 50 Years of Scanning Electron Microscopy of Bone—a Comprehensive Overview of the Important Discoveries Made and Insights Gained into Bone Material Properties in Health, Disease, and Taphonomy ». *Bone Research* 7: 15.  
<https://doi.org/10.1038/s41413-019-0053-z>.
- Sharp, A. H., F. C. Nucifora, O. Blondel, C. A. Sheppard, C. Zhang, S. H. Snyder, J. T. Russell, D. K. Ryugo, et C. A. Ross. 1999. « Differential Cellular Expression of Isoforms of Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptors in Neurons and Glia in Brain ». *The Journal of Comparative Neurology* 406 (2): 207-20.
- Sherwood, Mark W., Misa Arizono, Aude Panatier, Katsuhiko Mikoshiba, et Stéphane H. R. Oliet. 2021. « Astrocytic IP<sub>3</sub>Rs: Beyond IP<sub>3</sub>R<sub>2</sub> ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15: 695817. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.695817>.
- Sherwood, Mark William, Misa Arizono, Chihiro Hisatsune, Hiroko Bannai, Etsuko Ebisui, John Lawrence Sherwood, Aude Panatier, Stéphane Henri Richard Oliet, et Katsuhiko Mikoshiba. 2017. « Astrocytic IP<sub>3</sub> Rs: Contribution to Ca<sup>2+</sup> Signalling and Hippocampal LTP ». *Glia* 65 (3): 502-13.  
<https://doi.org/10.1002/glia.23107>.
- Shigetomi, Eiji, Eric A. Bushong, Martin D. Haustein, Xiaoping Tong, Olan Jackson-Weaver, Sebastian Kracun, Ji Xu, Michael V. Sofroniew, Mark H. Ellisman, et Baljit S. Khakh. 2013. « Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses ». *The Journal of General Physiology* 141 (5): 633-47.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.201210949>.
- Shigetomi, Eiji, Yukiho J. Hirayama, Kazuhiro Ikenaka, Kenji F. Tanaka, et Schuichi Koizumi. 2018. « Role of Purinergic Receptor P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> in Spatiotemporal Ca<sup>2+</sup> Dynamics in Astrocytes ». *Journal of Neuroscience* 38 (6): 1383-95.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2625-17.2017>.
- Shigetomi, Eiji, Olan Jackson-Weaver, Robert T. Huckstepp, Thomas J. O'Dell, et Baljit S. Khakh. 2013. « TRPA<sub>1</sub> Channels Are Regulators of Astrocyte Basal Calcium Levels and Long-Term Potentiation via Constitutive D-Serine Release ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (24): 10143-53. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5779-12.2013>.
- Shigetomi, Eiji, Sandip Patel, et Baljit S. Khakh. 2016. « Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling ». *Trends in Cell Biology* 26 (4): 300-312.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.003>.

## BIBLIOGRAPHIE

- Shimoni, E., et M. Müller. 1998. « On Optimizing High-Pressure Freezing: From Heat Transfer Theory to a New Microbiopsy Device ». *Journal of Microscopy* 192 (Pt 3): 236-47. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1998.00389.x>.
- Skepper, J. N. 2000. « Immunocytochemical Strategies for Electron Microscopy: Choice or Compromise ». *Journal of Microscopy* 199 (Pt 1): 1-36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00704.x>.
- Spampinato, Simona Federica, Agata Copani, Ferdinando Nicoletti, Maria Angela Sortino, et Filippo Caraci. 2018. « Metabotropic Glutamate Receptors in Glial Cells: A New Potential Target for Neuroprotection? » *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00414>.
- Spehner, Daniele, Anna M. Steyer, Luca Bertinetti, Igor Orlov, Lucas Benoit, Karin Pernet-Gallay, Andreas Schertel, et Patrick Schultz. 2020. « Cryo-FIB-SEM as a Promising Tool for Localizing Proteins in 3D ». *Journal of Structural Biology* 211 (1): 107528. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107528>.
- Srinivasan, Rahul, Tsai-Yi Lu, Hua Chai, Ji Xu, Ben S. Huang, Peyman Golshani, Giovanni Coppola, et Baljit S. Khakh. 2016. « New Transgenic Mouse Lines for Selectively Targeting Astrocytes and Studying Calcium Signals in Astrocyte Processes In Situ and In Vivo ». *Neuron* 92 (6): 1181-95. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.030>.
- Stogsdill, Jeff A., Juan Ramirez, Di Liu, Yong Ho Kim, Katherine T. Baldwin, Eray Enustun, Tiffany Ejikeme, Ru-Rong Ji, et Cagla Eroglu. 2017. « Astrocytic Neuroligins Control Astrocyte Morphogenesis and Synaptogenesis ». *Nature* 551 (7679): 192-97. <https://doi.org/10.1038/nature24638>.
- Straehle, C. N., U. Köthe, G. Knott, et F. A. Hamprecht. 2011. « Carving: Scalable Interactive Segmentation of Neural Volume Electron Microscopy Images ». *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention: MICCAI ... International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* 14 (Pt 1): 653-60. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23623-5\\_82](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23623-5_82).
- Südhof, Thomas C. 2012. « Calcium Control of Neurotransmitter Release ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (1): a011353. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011353>.
- Surdo, Nicoletta C., Marco Berrera, Andreas Koschinski, Marcella Brescia, Matias R. Machado, Carolyn Carr, Peter Wright, et al. 2017. « FRET Biosensor Uncovers CAMP Nano-Domains at  $\beta$ -Adrenergic Targets That Dictate Precise Tuning of Cardiac Contractility ». *Nature Communications* 8 (1): 15031. <https://doi.org/10.1038/ncomms15031>.
- Suzuki, Akinobu, Sarah A. Stern, Ozlem Bozdagi, George W. Huntley, Ruth H. Walker, Pierre J. Magistretti, et Cristina M. Alberini. 2011. « Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation ». *Cell* 144 (5): 810-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>.
- Sviben, Sanja, Assaf Gal, Matthew A. Hood, Luca Bertinetti, Yael Politi, Mathieu Bennet, Praveen Krishnamoorthy, et al. 2016. « A Vacuole-like Compartment Concentrates a Disordered Calcium Phase in a Key Coccolithophorid Alga ». *Nature Communications* 7 (1): 11228. <https://doi.org/10.1038/ncomms11228>.
- Takano, Takahiro, Wei He, Xiaoning Han, Fushun Wang, Qiwu Xu, Xiaohai Wang, Nancy Ann Oberheim Bush, Nancy Cruz, Gerald A. Dienel, et Maiken Nedergaard. 2014. « Rapid manifestation of reactive astrogliosis in acute hippocampal brain slices ». *Glia* 62 (1): 78-95. <https://doi.org/10.1002/glia.22588>.

- Takano, Tetsuya, John T. Wallace, Katherine T. Baldwin, Alicia Purkey, Akiyoshi Uezu, Jamie L. Courtland, Erik J. Soderblom, et al. 2020. « Chemico-genetic discovery of astrocytic control of inhibition in vivo ». *Nature* 588 (7837): 296-302. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2926-0>.
- Takata, Norio, Tsuneko Mishima, Chihiro Hisatsune, Terumi Nagai, Etsuko Ebisui, Katsuhiko Mikoshiba, et Hajime Hirase. 2011. « Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity in Vivo ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (49): 18155-65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-11.2011>.
- Takata, Norio, Terumi Nagai, Katsuya Ozawa, Yuki Oe, Katsuhiko Mikoshiba, et Hajime Hirase. 2013. « Cerebral Blood Flow Modulation by Basal Forebrain or Whisker Stimulation Can Occur Independently of Large Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Signaling in Astrocytes ». *PLoS One* 8 (6): e66525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066525>.
- Tanaka, Mika, Pei-Yu Shih, Hiroshi Gomi, Takamasa Yoshida, Junichi Nakai, Reiko Ando, Teiichi Furuichi, Katsuhiko Mikoshiba, Alexey Semyanov, et Shigeyoshi Itohara. 2013. « Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals are required for the functional integrity of tripartite synapses ». *Molecular Brain* 6 (1): 6. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-6>.
- Tanimura, Akihiko, Tetsuya Mochizuki, Takao Morita, Akihiro Nezu, Yosuke Tojyo, Mitsuhiro Arisawa, et Satoshi Shuto. 2013. « A Fluorescence-Based Method for Evaluating Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Ligands: Determination of Subtype Selectivity and Partial Agonist Effects ». *Journal of Biotechnology* 167 (3): 248-54. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.012>.
- Tao-Cheng, Jung-Hwa, Virginia Crocker, Sandra Lara Moreira, et Rita Azzam. 2021. « Optimization of Protocols for Pre-Embedding Immunogold Electron Microscopy of Neurons in Cell Cultures and Brains ». <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-268115/v1>.
- Taylor, Colin W. 2017. « Regulation of IP<sub>3</sub> Receptors by Cyclic AMP ». *Cell Calcium, Calcium Signaling: from Stores to Channels Honoring James W. Putney Jr*, 63 (mai): 48-52. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.10.005>.
- Theodosis, Dionysia T., Dominique A. Poulain, et Stéphane H. R. Oliet. 2008. « Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions ». *Physiological Reviews* 88 (3): 983-1008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007>.
- Tong, Xiaoping, Eiji Shigetomi, Loren L. Looger, et Baljit S. Khakh. 2013. « Genetically Encoded Calcium Indicators and Astrocyte Calcium Microdomains ». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 19 (3): 274-91. <https://doi.org/10.1177/1073858412468794>.
- Toni, N., P. A. Buchs, I. Nikonenko, P. Povilaitite, L. Parisi, et D. Muller. 2001. « Remodeling of Synaptic Membranes after Induction of Long-Term Potentiation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (16): 6245-51.
- Toni, N., P.-A. Buchs, I. Nikonenko, C. R. Bron, et D. Muller. 1999. « LTP Promotes Formation of Multiple Spine Synapses between a Single Axon Terminal and a Dendrite ». *Nature* 402 (6760): 421-25. <https://doi.org/10.1038/46574>.
- Ueda, Tetsufumi. 2016. « Vesicular Glutamate Uptake ». *Advances in Neurobiology* 13: 173-221. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_7).
- Van Harreveld, A., et Jana Steiner. 1970. « Extracellular Space in Frozen and Ethanol Substituted Central Nervous Tissue ». *The Anatomical Record* 166 (1): 117-29. <https://doi.org/10.1002/ar.1091660109>.

## BIBLIOGRAPHIE

- Vance, Jean E. 2014. « MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (4): 595-609. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.014>.
- Vargas, Jay R., Daniel K. Takahashi, Kyle E. Thomson, et Karen S. Wilcox. 2013. « The Expression of Kainate Receptor Subunits in Hippocampal Astrocytes Following Experimentally Induced Status Epilepticus ». *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72 (10): 10.1097/NEN.obo13e3182a4b266. <https://doi.org/10.1097/NEN.obo13e3182a4b266>.
- Verkhratsky, Alexei, et Frank Kirchhoff. 2007. « NMDA Receptors in Glia ». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 13 (1): 28-37. <https://doi.org/10.1177/1073858406294270>.
- Verkhratsky, Alexei, et Maiken Nedergaard. 2018. « Physiology of Astroglia ». *Physiological Reviews* 98 (1): 239-389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>.
- Verkhratsky, Alexei, Reno C. Reyes, et Vladimir Parpura. 2014. « TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia ». *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 166: 1-22. [https://doi.org/10.1007/112\\_2013\\_15](https://doi.org/10.1007/112_2013_15).
- Vezzoli, E, C Cali, M De Roo, L Ponzoni, E Sogne, N Gagnon, M Francolini, et al. 2020. « Ultrastructural Evidence for a Role of Astrocytes and Glycogen-Derived Lactate in Learning-Dependent Synaptic Stabilization ». *Cerebral Cortex (New York, NY)* 30 (4): 2114-27. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz226>.
- Vidavsky, Netta, Anat Akiva, Ifat Kaplan-Ashiri, Katya Rechav, Lia Addadi, Steve Weiner, et Andreas Schertel. 2016. « Cryo-FIB-SEM Serial Milling and Block Face Imaging: Large Volume Structural Analysis of Biological Tissues Preserved Close to Their Native State ». *Journal of Structural Biology* 196 (3): 487-95. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.09.016>.
- Vincent, Amy E., Doug M. Turnbull, Veronica Eisner, György Hajnóczky, et Martin Picard. 2017. « Mitochondrial Nanotunnels ». *Trends in Cell Biology* 27 (11): 787-99. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.009>.
- Virchow, Rudolf. 1858. « Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung Auf Physiologische Und Pathologische Gewebelehre. Berlin: August Hirschwald ». 1858. <https://www.christies.com/en/lot/lot-5084362>.
- Volterra, Andrea, Nicolas Liaudet, et Iaroslav Savtchouk. 2014. « Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Signalling: An Unexpected Complexity ». *Nature Reviews Neuroscience* 15 (5): 327-35. <https://doi.org/10.1038/nrn3725>.
- Wei, Dongguang, Scott Jacobs, Shannon Modla, Shuang Zhang, Carissa L. Young, Robert Cirino, Jeffrey Caplan, et Kirk Czymmek. 2012. « High-Resolution Three-Dimensional Reconstruction of a Whole Yeast Cell Using Focused-Ion Beam Scanning Electron Microscopy ». *BioTechniques* 53 (1): 41-48. <https://doi.org/10.2144/000113850>.
- Williamson, Michael R., Cathleen Joy A. Fuertes, Andrew K. Dunn, Michael R. Drew, et Theresa A. Jones. 2021. « Reactive astrocytes facilitate vascular repair and remodeling after stroke ». *Cell reports* 35 (4): 109048. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109048>.
- Witcher, Mark R., Sergei A. Kirov, et Kristen M. Harris. 2007. « Plasticity of Perisynaptic Astroglia during Synaptogenesis in the Mature Rat Hippocampus ». *Glia* 55 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1002/glia.20415>.
- Witcher, Mark R., Yong D. Park, Mark R. Lee, Suash Sharma, Kristen M. Harris, et Sergei A. Kirov. 2009. « Three-Dimensional Relationships between

- Perisynaptic Astroglia and Human Hippocampal Synapses ». *Glia*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/glia.20946>.
- Wolosker, Herman, et Darrick T. Balu. 2020. « D-Serine as the Gatekeeper of NMDA Receptor Activity: Implications for the Pharmacologic Management of Anxiety Disorders ». *Translational Psychiatry* 10 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00870-x>.
- Wong, Andrew D., Mao Ye, Amanda F. Levy, Jeffrey D. Rothstein, Dwight E. Bergles, et Peter C. Searson. 2013. « The blood-brain barrier: an engineering perspective ». *Frontiers in Neuroengineering* 6 (août): 7. <https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>.
- Yi, Hong, Jan L. M. Leunissen, Ge-Ming Shi, Claire-Anne Gutekunst, et Steven M. Hersch. 2001. « A Novel Procedure for Pre-Embedding Double Immunogold–Silver Labeling at the Ultrastructural Level ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49 (3): 279-83. <https://doi.org/10.1177/002215540104900301>.
- Zhang, Ye, Kenian Chen, Steven A. Sloan, Mariko L. Bennett, Anja R. Scholze, Sean O’Keeffe, Hemali P. Phatnani, et al. 2014. « An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (36): 11929-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>.
- Zito, Karen, Dorit Parnas, Richard D. Fetter, Ehud Y. Isacoff, et Corey S. Goodman. 1999. « Watching a Synapse Grow: Noninvasive Confocal Imaging of Synaptic Growth in *Drosophila* ». *Neuron* 22 (4): 719-29. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80731-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80731-X).