

2m11.28 21.5

Université de Montréal

Interactions neurone-glie
dans l'hippocampe chez le rat

par

Isabelle Latour

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
En sciences neurologiques

Octobre, 1999

© Isabelle Latour, 1999



W
4
158
2000
N. 119



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Interactions neurone-glie
dans l'hippocampe chez le rat

Présenté par:

Isabelle Latour

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Réjean Dubuc, Ph.D.	Président du jury
Richard Robitaille, Ph.D.	Directeur de recherche
Jean-Claude Lacaille, Ph.D.	Codirecteur de recherche
Dr Rhoda L. Kenigsberg, Ph.D.	Examinatrice externe

Mémoire accepté le: 2000-02-15

SOMMAIRE

Les mécanismes à l'origine des réponses calciques évoquées par le glutamate, appliqué localement ou libéré synaptiquement dans des tranches d'hippocampe de rat, ont été étudiés chez les cellules gliales *in situ*. Pour ce faire, nous avons utilisé un indicateur fluorescent de calcium perméable à la membrane, le fluo 3-AM et la microscopie confocale au laser. Les cellules étudiées possèdent des propriétés morphologiques et électrophysiologiques typiques des astrocytes: un corps cellulaire de petite taille (10-15 μ m), un couplage intercellulaire prononcé, un potentiel membranaire de repos moyen très négatif (-71 ± 2.2 mV) et une absence de potentiel d'action lors d'une dépolarisation de la membrane. Les réponses calciques gliales induites par l'application locale de glutamate n'ont pas été affectées par la tétradotoxine, un bloqueur des canaux sodiques voltage-dépendants, indiquant un effet direct du glutamate sur les cellules gliales. Par ailleurs, elles ont été réduites significativement par un bloqueur des canaux calciques de type L, la nimodipine, un antagoniste des récepteurs glutamatergiques métabotropiques de groupe I/II, le (S)- α -méthyl-4-carboxyphénylglycine (MCPG) et un antagoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), l'acide (\pm)2-amino-5-phosphonopentanoïque (APV). Les réponses calciques induites par l'application locale de glutamate n'ont pas été affectées significativement par un antagoniste des récepteurs non-NMDA, le 6-cyano-7-nitro-quinoline-2,3-dione (CNQX). Ces résultats indiquent que l'application locale de glutamate augmente la concentration intracellulaire de calcium via l'activation des canaux calciques de type L, des récepteurs NMDA et des récepteurs glutamatergiques métabotropiques de groupe I/II. Une brève téτανisation (1s) des fibres collatérales de

Schaffer a produit des élévations calciques intracellulaires chez les cellules gliales. Ces réponses étaient dépendantes de la fréquence de stimulation ($\geq 50\text{Hz}$) ainsi que de la transmission synaptique car elles ont été abolies par la tétrodotoxine. Ces élévations calciques évoquées par la stimulation étaient également éliminées par le bloqueur des canaux calciques de type L, la nimodipine, et l'antagoniste des récepteurs glutamatergiques métabotropiques de groupe I/II, le MCPG. Le CNQX, l'antagoniste des récepteurs non-NMDA, mais non l'APV, l'antagoniste des récepteurs NMDA, a aussi significativement réduit les réponses calciques évoquées par la stimulation des fibres collatérales de Schaffer. Par conséquent, les réponses calciques gliales produites par l'activité synaptique requièrent l'activation des canaux calciques de type L, des récepteurs glutamatergiques métabotropiques de groupe I/II et des récepteurs non-NMDA. Les élévations calciques intracellulaires observées chez les cellules gliales *in situ* suivant l'application locale de glutamate ou la libération de glutamate par une brève tétanisation des fibres collatérales de Schaffer partagent des mécanismes similaires (l'activation de canaux calciques de type L et de récepteurs glutamatergiques métabotropiques de groupe I/II), mais possèdent aussi des composantes distinctes (activation de récepteurs NMDA et non-NMDA, respectivement). Ces résultats indiquent que les interactions neurone-glie, dans l'hippocampe chez le rat nécessitent l'activation de plusieurs processus régulant le niveau de calcium intracellulaire, qui ne semblent pas reproduits lors de l'application locale de glutamate.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS	VIII
REMERCIEMENTS	X
CHAPITRE I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	11
1. LES CELLULES GLIALES	11
1.1 Les microglies	12
1.2 Les oligodendrocytes	13
1.3 Les astrocytes	14
1.3.1 Hétérogénéité des astrocytes	14
1.4 Les cellules épendymaires	17
1.5 La glie radiale	18
2. FONCTIONS TRADITIONNELLES DES ASTROCYTES	19
2.1 Rôles des astrocytes lors de conditions pathologiques	22
3. NOUVELLES PERSPECTIVES SUR LE RÔLE DES CELLULES GLIALES	22
3.1 Interactions synapse-glie dans le système nerveux périphérique	24
3.2 Interactions neurone-glie en culture	25
3.3 Interactions neurone-glie <i>in situ</i>	26
4. L'HIPPOCAMPE	27
5. LE GLUTAMATE	29
5.1 Les récepteurs NMDA	30
5.2 Les récepteurs non-NMDA	31
5.3 Les récepteurs glutamatergiques métabotropiques	32
6. LES INTERACTIONS NEURONE-GLIE DANS L'HIPPOCAMPE	33
7. OBJECTIFS	35
CHAPITRE II. COMMON AND DISTINCT MECHANISMS OF CA ²⁺ RESPONSES EVOKED IN GLIAL CELLS BY LOCAL APPLICATION OF GLUTAMATE VS BRIEF TETANIZATION OF SCHAFFER COLLATERALS IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES.	37
1. ABSTRACT	38
2. INTRODUCTION	40
3. MATERIALS AND METHODS	42
4. RESULTS	46
5. DISCUSSION	56

6. REFERENCES	65
7. FIGURE LEGENDS.....	72
CHAPITRE III. DISCUSSION GÉNÉRALE	89
1. CARACTÉRISTIQUES DES RÉPONSES CALCIFIQUES INDUITES CHEZ LES CELLULES GLIALES PAR LE GLUTAMATE ET L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE	89
1.1 Homogénéité des réponses calcifiques.....	89
1.2 Effet de la fréquence de stimulation sur les réponses calcifiques	91
1.3 Contribution des canaux calcifiques de type L	93
1.4 Implication des récepteurs glutamatergiques.....	95
1.4.1 Les récepteurs métabotropiques	95
1.4.2 Les récepteurs NMDA.....	97
1.4.3 Les récepteurs non-NMDA	99
1.5 Implications fonctionnelles des élévations calcifiques gliales.....	100
2. PERSPECTIVES FUTURES	102
CONCLUSIONS.....	107
SOURCES DOCUMENTAIRES	108

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Electrophysiological and morphological identification of glial cells.....	78
Figure 2: Glutamate-evoked Ca^{2+} responses in fluo-3 AM labelled glial cells.....	79
Figure 3: Stability of Ca^{2+} responses evoked by repeated applications of glutamate and insensitivity to tetrodotoxin (TTX).....	80
Figure 4: Different types of Ca^{2+} responses in glial cells.....	81
Figure 5: Partial antagonism of glutamate-evoked responses by the NMDA antagonist APV.....	82
Figure 6: Antagonism of glutamate-evoked Ca^{2+} responses by the L-type Ca^{2+} channel antagonist nimodipine and the group I/II mGluR antagonist MCPG.	83
Figure 7: Ca^{2+} responses elicited in glial cells by Schaffer collateral stimulation.	84
Figure 8: Reversible block of stratum radiatum-evoked field potentials and Ca^{2+} responses by tetrodotoxin.	85
Figure 9: Frequency-dependence of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses.	86
Figure 10: Partial antagonism of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses by the non-NMDA antagonist CNQX.....	87
Figure 11: Near complete block of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses by the L-type Ca^{2+} channel antagonist nimodipine and the group I/II mGluR antagonist MCPG. .	88
Figure 12: Interactions neurone-glie dans l'hippocampe.....	106

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

t-ACPD	Acide 1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylique
ATP	Adénosine triphosphate
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone propionique
APV	Acide (\pm)2-amino-5-phosphonopentanoïque
Ca²⁺	Calcium
[Ca²⁺]_i	Concentration intracellulaire de calcium
Cl⁻	Chlore
CNQX	6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione
CSP	Cellules de Schwann périssynaptiques
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GTP	Guanosine triphosphate
iGluR	Récepteur glutamatergique ionotropique
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
nmj	Jonction neuro-musculaire
K⁺	Potassium
MCPG	(S)- α -méthyl-4-carboxyphénylglycine
Mg²⁺	Magnésium
mGluR	Récepteur glutamatergique métabotropique
Na⁺	Sodium
NGF	Facteur de croissance nerveuse

NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PCP	Phencyclidine
PLT	Potentialisation à long terme
PPSE	Potentiel post-synaptique excitateur
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TTX	Tétradotoxine

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes directeurs de recherche, les Drs Richard Robitaille et Jean-Claude Lacaille, pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir ce merveilleux champ d'études et pour leur persévérance. J'aimerais également remercier le docteur Christine E. Gee pour son support technique et pour sa patience. Ils furent grandement appréciés. Merci à Douglas Sakamoto pour la mise en page.

CHAPITRE I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

La communication dans le système nerveux central (SNC) s'effectue par la transmission synaptique au niveau des synapses, les zones de contact entre deux neurones (Usherwood et al., 1968; Kelly, 1967). La propagation du potentiel d'action, une dépolarisation de la membrane cellulaire produite par l'entrée d'ions sodium (Na^+) et la sortie d'ions potassium (K^+) du cytoplasme (Singh, 1964; Melvin, 1965), active des canaux calciques voltage-dépendants aux terminaisons axonales du neurone pré-synaptique (Beattie et al., 1986; Bollmann et al., 1998). Ces canaux calciques forment des microdomaines (Llinas et al., 1992) et se retrouvent étroitement associés aux vésicules synaptiques prêtes à fusionner avec la membrane pré-synaptique (Dreyer et al., 1973). La hausse locale de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire à ces zones actives induit la fusion des vésicules et la libération de neurotransmetteurs par les terminaisons (Rubin, 1970; Yarom et al., 1985). Les neurotransmetteurs sont excitateurs ou inhibiteurs, modulant à la hausse ou à la baisse l'activité des cellules post-synaptiques (Rowe & Ruddock, 1982; De Feudis, 1982). Ces messagers chimiques permettent aux neurones d'interagir de façon spécifique avec leurs cellules cibles. Cette conception du fonctionnement du SNC met l'emphase sur les neurones. Il existe pourtant un autre type cellulaire remplissant des fonctions importantes dans le SNC: les cellules gliales.

1. LES CELLULES GLIALES

Le mot "glie" provient du grec glia et signifie "colle" (Kimelberg & Norenberg, 1989). Cette attribution provient du fait que les cellules gliales remplissent l'espace interneuronal, supportent les neurones et maintiennent la cohésion entre-eux (Peters et al., 1991). Cette

représentation plutôt passive des cellules gliales s'illustre par leur incapacité à générer des potentiels d'action, cette caractéristique étant exclusive aux neurones dans le SNC (Smith, 1992). Il existe plusieurs types de cellules gliales, les principales étant les microglies, les oligodendrocytes, les astrocytes, les cellules épendymaires et la glie radiale.

1.1 Les microglies

Les microglies proviendraient de monocytes du sang ayant migré dans le tissu nerveux avant la formation complète de la barrière hémato-encéphalique (Boya et al., 1987; Hickey & Kimura, 1988). Les monocytes se développeraient en un type cellulaire intermédiaire, la microglie améboïde (Innocenti et al., 1983), puis en microglie ramifiée présente dans le SNC normal adulte (Davis et al., 1994). Chez le rat, la microglie améboïde est une population transitoire présente à la fin de la période prénatale et au début de la période postnatale (Ivy & Killackey, 1978). Elles joueraient un rôle dans la réorganisation des connexions du SNC en développement en éliminant par phagocytose certains prolongements neuronaux et débris cellulaires résultant de la mort neuronale naturelle (Ferrer, 1990; Dalmau et al., 1998). Les microglies ramifiées, présentes dans le cerveau normal adulte, possèdent un corps cellulaire de très petite taille (5-10 μ m) et de nombreux prolongements (Boya et al., 1991). Elles composeraient environ 10% de la population cellulaire totale du SNC (Glenn et al., 1992).

Les microglies semblent remplir un rôle trophique neuronal et glial en exprimant des neurotrophines de la famille du NGF (facteur de croissance nerveuse), qui favorise le développement et le fonctionnement neuronal (Elkabes et al., 1996) et l'Interleukine 1, un facteur de croissance astrocytaire (Giulian et al., 1988). Cette fonction trophique est appuyée par une

étude démontrant que la présence de microglies dans les cultures de neurones favorise la survie neuronale (Zhang & Fedoroff, 1996).

Lorsque survient une lésion neuronale, les microglies ramifiées deviennent “réactives”; leur corps cellulaire gonfle, elles prolifèrent, migrent vers le site de la lésion et phagocytent les débris et corps étrangers (Akiyama et al., 1988; Stagaard et al., 1987; Davis et al., 1994; Bruce-Keller, 1999). Ces altérations fonctionnelles et morphologiques seraient produites, entre autres, par des signaux phagocytaires (Zymosan A), neurotransmetteurs, cytokines (interferon γ) et immunoactivateurs (protéine virale gp120) libérés par les neurones (Giulian, 1995; Bruce-Keller, 1999).

1.2 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes du SNC constituent une population cellulaire polymorphique (Hampson & Robinson, 1995; Weruaga-Prieto et al., 1996). Ils ont été classifiés par Rio Hortega (1928) en quatre groupes selon la taille de leur corps cellulaire, le nombre de leurs prolongements et leur association aux axones. Les oligodendrocytes de type I possèdent de nombreux prolongements et un corps cellulaire mesurant environ 15-20 μm ; ceux de type II se retrouvent seulement dans la matière blanche, sont observés à proximité des neurones et possèdent un corps cellulaire mesurant environ 20-40 μm ; ceux de type III possèdent trois ou quatre prolongements et se retrouvent dans les pédoncules, la médulla et la moëlle épinière; finalement, les oligodendrocytes de type IV sont présents près de l'entrée des racines nerveuses dans le SNC et sont étroitement associés aux larges axones. Dans la matière blanche, la plupart des oligodendrocytes enroulent leur membrane autour des axones, formant ainsi la myéline

(Szuchet, 1995). Il est fréquent qu'un oligodendrocyte myélinise plusieurs axones (Waxman & Sims, 1984; Hildebrand et al., 1993). La myéline permet une isolation de haute résistance et de faible capacitance des axones (Szuchet et al., 1988). Par conséquent, elle permet une conduction beaucoup plus rapide des potentiels d'action (Bosio et al., 1998). Chez le rat, la myélinisation de la moëlle épinière débute dans la période prénatale, tandis qu'elle débute au 12^e jour postnatal pour les structures cérébrales comme le corps calleux (Bjartmar et al., 1994).

1.3 Les astrocytes

Les astrocytes, nommés ainsi pour leur forme étoilée, sont les cellules gliales les plus nombreuses. Ils ont été divisés en deux groupes principaux: les astrocytes fibreux et protoplasmiques (Rio Hortega, 1918). Les astrocytes fibreux possèdent de nombreux prolongements et se retrouvent surtout dans la matière blanche tandis que les astrocytes protoplasmiques ont une forme plus compacte et sont essentiellement présents dans la matière grise (Somjen, 1988). Les cellules épendymaires et la glie radiale sont considérées des sous-populations d'astrocytes, car elles remplissent des fonctions spécialisées.

1.3.1 Hétérogénéité des astrocytes

Historiquement, les astrocytes ont été identifiés par la présence d'une protéine filamenteuse du cytosquelette, la GFAP (protéine acide fibrillaire gliale) (Lazarides, 1982). La GFAP est la principale protéine impliquée dans la formation des filaments intermédiaires, de fines structures formant un réseau à l'intérieur du cytoplasme de certains astrocytes matures du SNC normal, servant entre autres à définir et maintenir la forme des astrocytes (Eng, 1985; Eliasson et al., 1999). La GFAP est exprimée par une certaine proportion d'astrocytes, pouvant

varier selon la région du SNC observée (Hajos & Zilles, 1995). Un exemple de cette variation régionale de l'expression de la GFAP est observé dans la couche radiatum de la région CA1 de l'hippocampe de rat adulte, où la proportion d'astrocytes sans GFAP peut atteindre 40% (Walz & Lang, 1998). Le nombre d'astrocytes avec GFAP pourrait également augmenter avec l'âge (Nixdorf-Bergweiler et al., 1994; Amenta et al., 1998) et lors de certaines conditions pathologiques (Tanaka et al., 1992; Eng & Ghirnikar, 1994; Walz & Lang, 1998). D'autres variations, notamment au niveau électrophysiologique (D'Ambrosio et al., 1998; McKhann II et al., 1997) et pharmacologique (McCarthy & Salm, 1991; Porter & McCarthy, 1997), semblent présentes chez les astrocytes.

Au niveau électrophysiologique, les profils des astrocytes peuvent varier selon leur localisation dans le SNC, ainsi qu'à l'intérieur d'une même région. En culture, on a observé une hétérogénéité de l'expression des canaux sodiques chez les astrocytes de la moëlle épinière (Black et al., 1994, 1995), ainsi que différents potentiels de repos membranaire d'astrocytes provenant du néocortex (McKhann II et al., 1997). Des variations électrophysiologiques ont également été identifiées *in situ* chez les astrocytes. Par exemple, dans les tranches d'hippocampe, une hétérogénéité des potentiels de repos membranaire a été observée. De plus, les astrocytes des régions CA1 et CA3 semblent posséder différentes résistances d'entrée et différents degrés de couplage intercellulaire (McKhann II et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998). En effet, l'étendue des résistances d'entrée des astrocytes de la région CA1 (de 15 à 195 M Ω) est plus petite que celle de la région CA3 (de 46 à 530 M Ω) et le degré de couplage intercellulaire est significativement plus élevé dans la région CA1 (D'Ambrosio et al., 1998). Chez les cellules gliales de Bergmann provenant de tranches du cervelet, une régulation développementale du

degré de couplage intercellulaire a été observée, telle qu'aucun couplage n'a été identifié chez les cellules provenant de souris âgées de cinq à sept jours post-nataux, alors qu'un degré de couplage élevé a été observé chez les cellules de souris âgées de 20 à 24 jours post-nataux (Muller et al., 1996).

Au niveau pharmacologique, les astrocytes en culture semblent exprimer différents récepteurs. Par exemple, chez les astrocytes provenant du striatum, les récepteurs à l'endothéline-1 sont uniformément distribués alors que les récepteurs alpha 1-adrénergiques et muscariniques sont distribués de façon hétérogène (Venance et al., 1998). Des récepteurs dopaminergiques ont été identifiés chez les astrocytes du striatum, mais non chez les astrocytes du cervelet (Bal et al., 1994). Chez les astrocytes du cortex, une expression différentielle des récepteurs glutamatergiques et sérotoninergiques a aussi été observée (Nilsson et al., 1991; McCarthy & Salm, 1991). De plus, ces neurotransmetteurs ont induit différentes formes temporelles d'élévations calciques chez les astrocytes (McCarthy & Salm, 1991).

Toutefois, les conditions de culture semblent pouvoir modifier la réponse des astrocytes à certains agonistes. En effet, une différence concernant la réponse des astrocytes en culture et isolés au glutamate, à la sérotonine et à l'adénosine triphosphate (ATP) a été observée (Cai & Kimelberg, 1997; Kimelberg et al., 1997). En effet, la majorité des astrocytes en culture provenant de l'hippocampe et du cortex répondent par une augmentation intracellulaire de calcium à l'application de sérotonine et d'ATP, mais répondent peu au glutamate (Cai & Kimelberg, 1997; Kimelberg et al., 1997). Par contre, des astrocytes isolés provenant des mêmes régions répondent préférentiellement au glutamate et répondent peu à l'application de sérotonine et d'ATP (Cai & Kimelberg, 1997; Kimelberg et al., 1997). Ces résultats suggèrent une certaine homogénéité de l'expression des récepteurs glutamatergiques, sérotoninergiques et à l'ATP chez

les astrocytes isolés provenant de deux régions distinctes, ainsi qu'un effet des conditions de culture sur l'expression de certains récepteurs.

Différents résultats ont également été obtenus concernant la réponse des astrocytes *in situ* aux agonistes glutamatergiques. L'application dans le milieu de perfusion de glutamate et des agonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropiques (kainate, AMPA et NMDA) et métabotropiques (t-ACPD: 1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid; Pasti et al., 1998) a induit des élévations calciques chez les astrocytes de rats âgés de 9 à 13 jours (Porter & McCarthy, 1995), ainsi que chez les astrocytes de rats matures âgés de 21 à 42 jours, sauf pour l'agoniste NMDA (Shelton & McCarthy, 1999). Par contre, d'autres n'ont rapporté aucune élévation calcique chez les astrocytes *in situ* suivant l'application des agonistes glutamatergiques, mais ont plutôt observé des réponses calciques chez les astrocytes suivant l'application de norépinéphrine (Duffy & MacVicar, 1995).

1.4 Les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires sont regroupées autour des vaisseaux sanguins et assurent la cohésion étanche entre les cellules endothéliales entourant les capillaires (Rubin & Staddon, 1999). L'étroite juxtaposition des cellules endothéliales et des cellules épendymaires limite l'accès de certaines substances au SNC en formant la barrière hémato-encéphalique. Bien que les cellules épendymaires ne possèdent pas des jonctions étroites complexes et des systèmes de transport spécialisés nécessaires à la perméabilité sélective de la barrière, elles contribueraient à la formation de ces composantes chez les cellules endothéliales (Hayashi et al., 1997; Risau et al., 1998; Pekny et al. 1998; Kuchler-Bopp et al., 1999). En effet, la présence d'astrocytes dans les cultures de cellules endothéliales semble favoriser la formation de leurs composantes

structurales, telles un espace intercellulaire restreint, la présence de jonction serrées et de filaments d'actine (composante du cytosquelette servant à donner la forme du cytoplasme et à le supporter) et physiologiques distinctes, telles leur résistance accrue à l'injection de courant et une diminution du passage du sucrose par diffusion (Kuchler-Bopp et al., 1999).

1.5 La glie radiale

La glie radiale est présente lors du développement du SNC (Pixley & DeVellis, 1984) et sert de substrat pour la migration des neurones vers leur destination dans une couche neuronale spécifique (Gasser & Hatten, 1990). Le neurone se déplace de la surface ventriculaire à la membrane piale le long de la glie radiale (Jaeger, 1988) en étendant un prolongement motile qu'il enroule autour de la glie (Gasser & Hatten, 1990). Le déplacement du neurone sur la glie radiale se ferait grâce à l'expression de certaines molécules d'adhésion, comme par exemple l'astrotactine, le facteur de croissance gliale et la protéine erbB par le neurone (Hatten, 1999) et de récepteurs correspondant sur les cellules gliales. La fixation de la molécule d'adhésion au récepteur formerait des zones de contact entre le neurone en migration et la glie radiale, facilitant son déplacement (Stitt et al., 1991). En plus de guider la migration des neurones, les astrocytes favoriseraient la croissance neuronale en libérant un facteur de croissance neuronale, le NGF (facteur de croissance nerveuse) (Schwartz & Mishler, 1990; Carman-Krzan et al., 1991), et en acheminant, par leurs terminaisons situées sur les capillaires, le glucose aux neurones (Forsyth, 1996).

2. FONCTIONS TRADITIONNELLES DES ASTROCYTES

Lors des premières observations des astrocytes, les chercheurs remarquèrent leur étroite association aux neurones et capillaires. Cette constatation suggéra un rôle possible des cellules gliales dans la régulation de certaines fonctions neuronales (Somjen, 1988). Plusieurs de ces hypothèses sont aujourd'hui appuyées par de nombreuses évidences démontrant le rôle des astrocytes dans le contrôle de la composition du milieu extracellulaire.

Un premier rôle homéostasique des astrocytes consiste à contrôler la concentration extracellulaire d'ions potassium (K^+). Lors de périodes d'activité neuronale, la concentration extracellulaire d'ions K^+ s'accroît. Afin de prévenir une hyperexcitabilité neuronale causée par une augmentation excessive du K^+ extracellulaire, les ions K^+ diffusent dans les astrocytes (Hertz et al., 1978). La membrane des astrocytes est hautement perméable au K^+ et donc leur potentiel d'équilibre membranaire s'approche du potentiel d'équilibre du K^+ (Orkand et al., 1966; Walz et al., 1984). Malgré cela, l'amplitude du courant potassique varie avec la concentration extracellulaire du K^+ , telle qu'une augmentation du K^+ extracellulaire augmente la conduction des canaux potassiques et permet l'entrée des ions K^+ . Par conséquent, le K^+ diffuse dans les astrocytes à cause du gradient de concentration (Newman, 1993). Étant donné que plusieurs astrocytes sont reliés entre-eux par des jonctions étroites et forment un syncytium (D'Ambrosio et al., 1998), le K^+ absorbé par les astrocytes peut alors se répartir à travers le réseau via les jonctions étroites et ressortir, par force électrogénique, à un endroit distant où la concentration extracellulaire en K^+ est plus faible (Orkand et al., 1966). Ce processus permet donc de redistribuer l'excès de K^+ vers des régions faibles en K^+ .

L'étroite association des astrocytes au système circulatoire et leur perméabilité potassique leur permettent de remplir une autre fonction: la vasodilatation (McCulloch et al., 1982). Dans la rétine, la membrane des terminaisons des cellules gliales de Muller est davantage perméable au K^+ que celle du corps cellulaire (Newman, 1986, 1993; Brew et al., 1986). Une telle distribution hétérogène des canaux potassiques serait aussi présente chez les astrocytes (Kettenmann, 1999). Etant donné que plusieurs astrocytes envoient leurs terminaisons sur les capillaires et que le K^+ absorbé lors de l'activité neuronale semble plus facilement expulsé par leurs terminaisons (Wolff, 1970), le K^+ expulsé par les astrocytes s'accumule près des vaisseaux sanguins. L'augmentation de la concentration extracellulaire de K^+ semble favoriser la dilatation des artères cérébrales (Paulson & Newman, 1987; McCarron et al., 1990; Harder et al., 1998) et par conséquent l'augmentation de la circulation sanguine (Tsubokawa et al. 1980; Sieber et al., 1993). Ce rôle du K^+ dans la vasodilatation ne semble pas exclusif au SNC, car il a également observé dans les muscles squelettiques (Haddy, 1987; Fujita & Ito, 1993; Wilson et al., 1994).

Une autre fonction homéostatique des astrocytes consiste à récupérer certains neurotransmetteurs libérés lors de la transmission synaptique, tels la sérotonine (Hirst et al., 1998), la dopamine (Inazu et al., 1999), l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), l'adénosine et le glutamate (Hertz et al., 1978), par des transporteurs spécifiques de haute affinité (Danbolt, 1994; Nelson, 1998). L'inactivation des neurotransmetteurs par la recapture est essentielle pour optimiser l'efficacité de la transmission synaptique en minimisant la durée d'action des neurotransmetteurs et, dans certains cas, pour prévenir l'excitotoxicité et la dégénérescence des neurones (Rothstein et al., 1996; Cebers et al., 1999). Les transporteurs pour, entre autres, la dopamine, la sérotonine, le GABA et la glycine utilisent le Na^+ et Cl^- , tandis que les transporteurs pour le glutamate et l'aspartate dépendent du Na^+ et du K^+ (Masson et al., 1999). Le gradient de

la concentration de Na^+ extracellulaire/intracellulaire est utilisé pour transporter les neurotransmetteurs à l'intérieur de la cellule. Dans le cas de transporteurs pour le glutamate, deux à trois molécules de Na^+ seraient couplées à une molécule de L-glutamate et seraient transportées dans le milieu intracellulaire, alors qu'un ion K^+ serait transporté dans le milieu extracellulaire (Seal & Amara, 1999). Les transporteurs glutamatergiques principaux du SNC, GLAST et GLT1, sont coexprimés sur les terminaisons astrocytaires (Gegelashvili & Schousboe, 1998).

Un autre rôle des astrocytes consiste en la régulation du pH extracellulaire (pH_e). L'activité neuronale normale (Kraig et al., 1983; Yamamoto et al., 1992) et certaines conditions pathologiques telles une ischémie, anoxie, hypoxie ou épilepsie (Ransom et al., 1992; Chen & Chesler, 1992; Rose & Deitmer, 1994) peuvent induire une fluctuation du pH_e . Cette variation du pH_e pourrait être causée, entre autres, par certains neurotransmetteurs tels le GABA (Kaila et al., 1990), le glutamate et l'aspartate (Chesler & Rice, 1991). Par exemple, le GABA induirait la sortie de bicarbonate via les canaux Cl^- neuronaux couplés aux récepteurs GABA (Kaila & Voipio, 1987) car ces canaux seraient également perméables aux ions HCO_3^- (bicarbonate) et leur ouverture induirait, par gradient électrique, la sortie du bicarbonate de la cellule et donc alcaliniserait le milieu extracellulaire (Kaila et al., 1990). Les astrocytes rétabliraient le pH_e en répondant, tout d'abord, à la hausse de la concentration extracellulaire de K^+ par une dépolarisation membranaire (Chesler & Kraig, 1987). Cette dépolarisation membranaire activerait un cotransporteur électrogénique de HCO_3^- et Na^+ qui transporterait le bicarbonate à l'intérieur des astrocytes et ainsi alcaliniserait le pH intracellulaire (pH_i) (Deitmer & Szatkowski, 1990). L'amplitude de l'alcalinisation observée serait proportionnelle à l'amplitude de la dépolarisation de la membrane (Chesler & Kraig, 1987). Le transport de bicarbonate à l'intérieur des astrocytes

acidifie le milieu extracellulaire et ainsi atténue l'alcalinisation du pH_e induite par l'activité neuronale (Jendolova & Sykova, 1991).

2.1 Rôles des astrocytes lors de conditions pathologiques

Certaines conditions pathologiques telles les traumatismes et ischémies induisent des changements osmotiques chez les astrocytes. Ainsi, l'absorption de l'excédent de K^+ induit une augmentation de l'osmolarité des astrocytes et favorise leur gonflement (Dietzel et al., 1982; Ransom et al., 1985; Bender et al., 1998). Ceci conduit à une réduction de l'espace extracellulaire (Plesnila et al., 1998).

Aussi, en réponse à des lésions neuronales importantes à un niveau rostral du SNC, une cascade d'événements conduit à une hypertrophie des astrocytes, leur migration vers le site de la lésion (Giulian, 1988) et la production d'une cicatrice gliale sur les axones endommagés (Reier, 1986; Fitch et al., 1999).

3. NOUVELLES PERSPECTIVES SUR LE RÔLE DES CELLULES GLIALES

Les fonctions traditionnelles attribuées aux astrocytes les représentent comme des cellules essentiellement passives, mais nécessaires au bon fonctionnement du SNC. Pourtant, les astrocytes possèdent des caractéristiques uniques, comme leur organisation en syncytium, leur emplacement près des axones et des synapses (Peters et al., 1976; Ventura & Harris, 1999) et leur lien privilégié avec les vaisseaux sanguins. Ces caractéristiques, outre leur utilité dans les fonctions régulatrices, pourraient permettre aux astrocytes de participer de manière plus active à l'activité synaptique. En effet, certains neurotransmetteurs libérés lors de la transmission

synaptique, en plus d'activer les neurones, activent également des récepteurs situés sur les astrocytes. Les astrocytes possèdent des récepteurs (Porter & McCarthy, 1997; Kimelberg, 1995), canaux ioniques (Bordey & Sontheimer, 1997) et systèmes de second messagers (Murphy & Pearce, 1987) similaires à ceux des neurones.

Bien que des canaux sodiques ont été identifiés chez des astrocytes en culture, notamment de la moëlle épinière (Reese & Caldwell, 1999; Black et al., 1995), du nerf optique (Minturn et al., 1990; Sontheimer et al., 1991), du cortex et cervelet (Oh et al., 1995), la propagation de potentiels d'action ne semble pas constituer le mode principal de communication des astrocytes du SNC. Ils semblent plutôt utiliser un système de communication via la propagation de vagues calciques (Smith, 1992), des élévations intracellulaires de calcium (Ca^{2+}) répétitives se propageant chez les cellules avoisinantes (Cornell-Bell et al., 1990). Ce phénomène de vagues calciques n'est pas exclusif aux astrocytes du SNC, car il a été observé dans différents types cellulaires de différentes espèces, par exemple chez les cellules endothéliales de l'aorte de boeuf (Demer et al., 1993), les hépatocytes du foie (Nathanson et al., 1995) et les kératocytes du poisson (Brust-Mascher et al., 1998). Chez les astrocytes du SNC, les vagues calciques sont induites par le glutamate (Cornell-Bell et al., 1990), l'adénosine triphosphate (ATP) (Guthrie et al., 1999), la stimulation mécanique (Newman & Zahs, 1998) et l'activité neuronale (Dani et al., 1992). Initialement, le mécanisme de propagation des vagues calciques proposé était la libération du Ca^{2+} intracellulaire induit par le mouvement de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) par les jonctions étroites (Boitano et al., 1992). Toutefois, une étude sur des souris knockout a démontré que la protéine principale formant les jonctions étroites chez les astrocytes (Cx43) n'est pas nécessaire pour la propagation des vagues calciques (Scemes et al., 1998). Récemment, il a été

suggéré que les vagues calciques se propageraient via la libération d'ATP par les astrocytes dans le milieu extracellulaire (Guthrie et al., 1999).

3.1 Interactions synapse-glie dans le système nerveux périphérique

Ces nouvelles perspectives sur les cellules gliales ont amené les chercheurs à proposer un rôle de la glie dans la modulation de l'activité synaptique. Tout d'abord, dans le système nerveux périphérique (SNP), la jonction neuro-musculaire (jnm) d'amphibien constitue un modèle simple et intéressant pour ce type d'études, car les éléments gliaux ainsi que pré- et postsynaptiques sont facilement identifiables et les interactions synapse-glie peuvent être étudiées au niveau d'une seule synapse (Robitaille, 1998). Les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSP) sont des cellules gliales du SNP et sont observées autour de la jnm. Comme les cellules gliales du SNC, elles possèdent des récepteurs et canaux ioniques (Robitaille et al., 1996) et répondent à la libération de neurotransmetteurs endogènes (Jahromi et al., 1992; Reist & Smith, 1992; Robitaille, 1995). La stimulation à haute fréquence du nerf moteur induit une élévation calcique chez la CSP en activant des récepteurs muscariniques, purinergiques et peptidergiques, fréquemment couplés à une protéine G (Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Bourque & Robitaille, 1998). Afin de déterminer si les CSP modulent l'activité synaptique, et en particulier si elles pourraient être impliquées dans la dépression de la transmission neuromusculaire induite par la stimulation à haute fréquence, un analogue nonhydrolyzable du guanosine triphosphate (GTP), $GTP\gamma S$, a été injecté dans les CSP (Robitaille, 1998). Les résultats démontrent que l'activation de la protéine G de la CSP par le $GTP\gamma S$ induit effectivement une réduction de la libération de neurotransmetteurs à la jnm. De plus, la dépression habituellement observée lors de

la stimulation à haute fréquence a pu être abolie par l'inactivation de la protéine G par l'injection du GDP β S dans la CSP.

3.2 Interactions neurone-glie en culture

Cette modulation de l'activité synaptique par les cellules gliales n'est pas une caractéristique propre des synapses du SNP, car un phénomène similaire a été observé dans les co-cultures de neurones et astrocytes (Parpura et al., 1994; Nedergaard, 1994; Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1998a,b). La stimulation des astrocytes par un stimulus mécanique (Newman & Zahs, 1998; Araque et al., 1998a) ou électrique (Nedergaard, 1994; Araque et al., 1998a,b) et l'application de bradykinine (Parpura et al., 1994) induit une élévation monophasique du Ca²⁺ intracellulaire (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998a,b) et des vagues calciques chez les astrocytes (Nedergaard, 1994; Newman & Zahs, 1998) en culture. Ces réponses calciques gliales produisent une hausse du Ca²⁺ intracellulaire des neurones (Nedergaard, 1994; Hassinger et al., 1995), suivie d'une augmentation de leurs courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs miniatures (Araque et al., 1998a,b) et la génération de potentiels d'action (Hassinger et al., 1995). Cette modulation de la transmission synaptique semble s'effectuer via une libération de glutamate Ca²⁺-dépendante par les astrocytes, car elle est inhibée par l'injection BAPTA (un chélateur de Ca²⁺) à l'intérieur des astrocytes et l'application d'antagonistes des iGluRs (Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1998a,b). Donc, en culture, l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire des astrocytes induit la libération de glutamate par les astrocytes via l'activation de mécanismes Ca²⁺-dépendants (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998) et module l'activité synaptique.

3.3 Interactions neurone-glie *in situ*

Depuis ces premières études en culture, l'existence d'une communication entre neurones et cellules gliales du SNC a également été démontrée *in situ* dans la rétine (Newman & Zahs, 1998), les tranches d'hippocampe (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998; Kang et al., 1998) et de cervelet (Grosche et al., 1999). La stimulation des astrocytes par un stimulus mécanique (Newman & Zahs, 1998), l'activation des interneurons par un agoniste GABAB (Kang et al., 1998) et la stimulation des afférences neuronales (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997) induit des élévations calciques monophasiques (Kang et al., 1998), oscillatoires (Pasti et al., 1997) et des vagues calciques chez les astrocytes (Hassinger et al., 1995; Newman & Zahs, 1998). Ces réponses calciques gliales induisent une élévation du Ca^{2+} intracellulaire neuronal (Hassinger et al., 1995; Pasti et al., 1997) ainsi qu'une hausse de leurs courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs miniatures (Kang et al., 1998). Dans la rétine, les vagues calciques astrocytaires inhiberaient l'activité des neurones (Newman & Zahs, 1998). Tel qu'observé dans les co-cultures, cette modulation de la transmission synaptique semble s'effectuer via une libération de glutamate Ca^{2+} -dépendante par les astrocytes, car elle est inhibée par l'injection BAPTA (un chélateur de Ca^{2+}) à l'intérieur des astrocytes et l'application d'antagonistes des iGluRs (Hassinger et al., 1995; Newman & Zahs, 1998; Kang et al., 1998). De plus, l'amplitude des vagues calciques astrocytaires semble corrélée à l'amplitude de la modulation de l'activité neuronale, démontrant ainsi le lien entre l'activité des cellules gliales et neuronales (Newman & Zahs, 1998; Pasti et al., 1997).

Bien que la libération synaptique de glutamate ou son application dans le bain induisent chez les astrocytes en culture des élévations calciques (Cornell-Bell et al., 1990; Jensen & Chiu,

1991; McCarthy & Salm, 1991; Smith, 1992; Dani et al., 1992; Shao & McCarthy, 1994; Harris-White et al., 1998), ces résultats demeurent peu représentatifs de la situation *in situ* ou *in vivo* car les conditions de culture peuvent influencer l'expression de certains canaux ioniques et récepteurs (Barres et al., 1990), l'activité des monoamines oxydases (Carlo et al., 1996) de même que la réponse à certains neurotransmetteurs (Shao et McCarthy, 1994; Cai & Kimleberg, 1997). Mais surtout, les cultures ne peuvent reproduire l'organisation cellulaire complexe et variée observée *in situ*, où les cellules gliales interagissent avec de nombreuses composantes du tissu nerveux et où les terminaisons gliales sont étroitement juxtaposées aux synapses et vaisseaux sanguins (Kimelberg, 1999; Ventura & Harris, 1999). Pour l'étude des interactions neurone-glie, les conditions expérimentales doivent représenter le plus fidèlement possible l'environnement cellulaire naturel. Par conséquent, il est absolument nécessaire d'utiliser une préparation *in situ* telle l'hippocampe, où l'organisation synaptique est connue et maintenue.

4. L'HIPPOCAMPE

L'hippocampe est étroitement impliquée dans les émotions et divers processus cognitifs tels l'apprentissage (Moser & Moser, 1999), la mémoire (Milner, 1966), les phénomènes de plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme synaptique (Bliss & Collingridge, 1993), ainsi que dans certaines conditions pathologiques comme l'épilepsie et l'ischémie (Macdonald & Kapur, 1999). En plus de son importance fonctionnelle, elle possède une organisation cellulaire ordonnée ainsi qu'une physiologie bien définie et très documentée et quelques études ont déjà démontré l'existence d'une communication entre neurones et glies dans cette structure (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998; Kang et al.,

1998). L'hippocampe est formé du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon (CA), comprenant chacune leur groupe cellulaire distinct: les cellules granulaires et les cellules pyramidales, respectivement. La corne d'Ammon est divisée en quatre régions: CA1, CA2, CA3 et CA4 (Kier et al., 1997). L'hippocampe comprend trois groupes de neurones de projection, les cellules du CA1, du CA3 et du gyrus dentelé, qui forment un circuit excitateur tri-synaptique (Andersen et al., 1969): 1) les axones provenant du cortex enthorinal, la voie perforante, forment des synapses avec les dendrites des cellules granulaires; 2) les axones des cellules granulaires, les fibres moussues, forment des synapses avec les dendrites des cellules pyramidales du CA3; et 3) les axones des cellules pyramidales du CA3, les fibres collatérales de Schaffer, forment des synapses avec les dendrites des cellules pyramidales du CA1 dans le *stratum radiatum*. La stimulation des fibres collatérales de Schaffer produit principalement la libération de glutamate (Collingridge et al., 1983), mais aussi de noradrénaline et de GABA (Jonzon & Fredholm, 1985). Chaque région de l'hippocampe possède son organisation cellulaire distincte. Seule l'organisation cellulaire du CA1 sera décrite, car il s'agit de la région d'intérêt du présent mémoire. La région du CA1 contient cinq couches (Ramon y Cajal, 1911): i) la couche *alveus* forme la partie la plus superficielle et est principalement composée des axones des cellules pyramidales; ii) la couche *oriens* est constituée des dendrites basaux des cellules pyramidales, de certains corps cellulaires d'interneurones bipolaires ou multipolaires (Lacaille et al., 1987) et de fibres commissurales provenant des régions CA3 ipsi- et controlatérales; iii) la couche *pyramidale* du CA1 contient principalement des cellules pyramidales, qui forment une couche compacte (Ishizuka et al., 1995), ainsi que quelques interneurones dispersés; iv) la couche *radiatum* est composée des dendrites apicaux des cellules pyramidales, de certains types d'interneurones et des fibres afférentes de la région CA3; finalement, la couche *lacunosum-moleculare*, adjacente à la fissure

hippocampique, est constituée des dendrites distaux des cellules pyramidales, de certains corps d'interneurones fusiformes localisés près de la couche *radiatum*, mesurant environ 15 x 25µm et possédant de nombreux prolongements (Kunkel et al., 1988), de même que certaines fibres afférentes du cortex enthorinal. Des astrocytes possédant un corps cellulaire oval et mesurant environ 10µm (D'Ambrosio et al., 1998) sont distribués dans les couches du CA1.

5. LE GLUTAMATE

Le glutamate est le principal médiateur des interactions synapses-glies du SNC et est libéré par exocytose de façon Ca^{2+} -dépendante par les neurones de l'hippocampe (Collingridge et al., 1983; Palmada & Centelles, 1998). Il agit sur des récepteurs glutamatergiques ionotropiques (iGluR), couplés à des canaux ioniques, et des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluR), couplés à des seconds messagers (Hollman & Heinemann, 1994; Palmada & Centelles, 1998). Les iGluR ont été divisés en trois groupes: NMDA, AMPA et kainate. Ils ont été nommés par leurs agonistes sélectifs et se distinguent par leur cinétique d'activation et de conduction, ainsi que par leurs différents antagonistes (Cull-Candy & Usowicz, 1987; Lerma et al., 1989; Fong et al., 1989). Les récepteurs non-NMDA sont perméables au Na^+ et au K^+ , bien que certains sous-types sont également perméables au Ca^{2+} , dépendamment de leur composition moléculaire. Les récepteurs NMDA, en plus d'être perméables au Na^+ et au K^+ , sont perméables au Ca^{2+} . Quant aux mGluRs, huit sous-types ont été identifiés jusqu'à présent (Nakanishi et al., 1998). Les récepteurs glutamatergiques semblent impliqués dans divers phénomènes tels l'apprentissage, la mémoire, la plasticité neuronale et la dégénérescence neuronale (Nakanishi, 1992). Des études récentes explorant les composantes moléculaires des récepteurs

glutamatergiques ont identifié différents agencements des sous-unités, hétérogènes quant à leurs propriétés fonctionnelles (Nakanishi, 1992).

5.1 Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont formés des sous-unités NMDA R1 et NMDA R2A-D, pouvant être assemblées différemment et ainsi former des récepteurs possédant différentes propriétés fonctionnelles (Monyer et al., 1994). Le glutamate est l'agoniste possédant la plus haute affinité pour le site NMDA. Le canal ionique couplé aux récepteurs NMDA est perméable au K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Les récepteurs NMDA comprennent trois sites modulateurs: un site modulateur glycinergique, un site de liaison de la phencyclidine (PCP) et un site pour le NMDA (Yamakura & Shimoji, 1999). Le site modulateur glycinergique est très important, car la glycine augmente l'affinité des agonistes NMDA au récepteur et augmente sa probabilité d'ouverture (Forsythe et al., 1988; Ransom & Stec, 1988). Le site de liaison du PCP est situé à l'intérieur du canal ionique et lorsque présente au site, la PCP empêche l'entrée des ions Na^+ et Ca^{2+} (Mayer & Westbrook, 1987; Balster & Willetts, 1988) et la sortie des ions K^+ (French-Mullen et al., 1989). Quant au canal ionique couplé au récepteur NMDA, il est bloqué par le magnésium (Mg^{2+}) de façon voltage-dépendante, telle qu'une concentration extracellulaire faible en Mg^{2+} et une dépolarisation de la membrane favorisent l'activation du canal et augmentent sa conductance (Nowak et al., 1984). L'activation des récepteurs NMDA génère un potentiel post-synaptique exciteur voltage-dépendant et lent (Forsythe et al., 1988).

Bien que la présence de récepteurs NMDA chez les astrocytes *in situ* demeure controversée (Shelton & McCarthy, 1999), des élévations calciques ont été observées suivant l'application de l'agoniste NMDA chez des astrocytes provenant de rats juvéniles (Porter &

McCarthy, 1995) et la présence des sous-unités NMDA R1 et NMDA R2A et B a été révélée par immunocytochimie chez des astrocytes du cortex provenant de rats adultes (Conti et al., 1996).

5.2 Les récepteurs non-NMDA

Les iGluRs non-NMDA incluent deux sous-types: AMPA et kainate. Les récepteurs AMPA sont formés des sous-unités GluR 1,2,3 et 4 (Verkhratsky et al., 1998). Ils possèdent une haute affinité pour l'agoniste AMPA, plus élevée que pour le glutamate et une faible affinité pour le kainate. Un antagoniste fréquemment utilisé pour les récepteurs non-NMDA, le CNQX, est peu sélectif pour les récepteurs kainate et AMPA (Honoré et al., 1988). Le canal ionique couplé aux récepteurs AMPA est perméable au K^+ et au Na^+ , mais certains sous-types possèdent une variation de leur perméabilité aux ions Ca^{2+} telle que la présence de la sous-unité GluR2 est associée à une faible perméabilité calcique des récepteurs AMPA, tandis que son absence semble favoriser une perméabilité accrue aux ions Ca^{2+} (Seeburg, 1993). Toutefois, les récepteurs AMPA seraient de cinq à dix fois moins perméables au Ca^{2+} que les récepteurs NMDA (Dingledine et al., 1992). De plus, l'influx de Ca^{2+} médié par les récepteurs non-NMDA n'aurait pas le même impact que le Ca^{2+} des récepteurs NMDA concernant par exemple la neurotoxicité, la potentialisation à long terme (LTP) et la libération de neurotransmetteurs. Chez les neurones, l'excitotoxicité semble principalement déclenchée par l'influx de Ca^{2+} via les récepteurs NMDA (Tymianski et al., 1993). L'influx de Ca^{2+} par les récepteurs NMDA semble aussi nécessaire pour l'induction de la LTP chez les neurones (Bliss & Collingridge, 1993). Il a également été démontré que l'influx de Ca^{2+} via les récepteurs NMDA pourrait moduler la libération de neurotransmetteurs (Cochilla & Alford, 1999), tandis que les récepteurs non-NMDA semblent peu impliqués dans cette modulation (Craig & White, 1993). Les récepteurs AMPA sont

responsables de la production du potentiel post-synaptique exciteur rapide (Zhang & Trussell, 1994). Par contre, ils se désensibilisent rapidement en réponse à leurs agonistes (Patneau et al., 1993).

Les récepteurs kainate sont formés des sous-unités GluR 5,6,7 ainsi que KA1 et KA2 (Chittajallu et al., 1999). Ils possèdent une haute affinité pour l'agoniste kainate, qui est plus élevée que pour le glutamate, ainsi qu'une faible affinité pour l'agoniste AMPA. Le canal ionique couplé à ces récepteurs est également perméable au K^+ et au Na^+ , mais lorsque la sous-unité GluR6 est présente, les récepteurs kainate sont perméables aux ions Ca^{2+} (Egebjerg & Heinemann, 1993). Les récepteurs kainate formés des sous-unités GluR5 et GluR6 se désensibiliseraient rapidement lors d'une application prolongée de kainate, alors que les récepteurs kainate formés des autres sous-unités se désensibiliseraient peu. Cette faible désensibilisation de certains récepteurs kainate permet de les différencier des récepteurs AMPA.

Chez les cellules gliales *in situ*, des élévations calciques ont été induites par l'application des agonistes kainate (Muller et al., 1992; Jabs et al., 1994; Porter & McCarthy, 1995) et AMPA (Porter & McCarthy, 1995; Seifert et al., 1997). L'étude des composantes moléculaires des récepteurs AMPA chez les astrocytes de l'hippocampe isolés et en culture semble indiquer la présence de la sous-unité GluR2 (Seifert et al., 1997; Fan et al., 1999), limitant ainsi la perméabilité calcique du récepteur.

5.3 Les récepteurs glutamatergiques métabotropiques

Contrairement aux iGluRs, les récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluRs) ne sont pas couplés à un canal ionique. Ils sont formés de sept domaines transmembranaires et ont été séparés en trois groupes selon leur homologie de séquence, leur mécanisme de transduction et

leur profil pharmacologique (Conn & Pin, 1997). Le groupe I comprend les sous-types mGluR1 et mGluR5, le groupe II les sous-types mGluR2 et mGluR3 et le groupe III, les sous-types mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Ils exercent leur effet via des seconds messagers intracellulaires activés par une protéine G (Ozawa et al., 1998), G_s , $G_{i/o}$ ou G_q (Balázs et al., 1998; Kostenis et al., 1998), qui se lie à une nucléotide guanine (Prezeau et al., 1992). La modulation de canaux ioniques et des récepteurs par les seconds messagers s'effectue entre autres par l'action directe du Ca^{2+} , des enzymes Ca^{2+} -dépendantes incluant des kinases et des phosphatases, par des produits de phospholipases ou, à l'intérieur de la membrane, par des actions de protéines G activées (Conn & Pin, 1997). Les mGluRs du groupe I activent le second messenger phospholipase C (Masu et al., 1991), qui augmente la production d'IP3. La fixation de l'IP3 sur son récepteur du réticulum endoplasmique induit la libération du Ca^{2+} intracellulaire (Ma et al., 1998). Les mGluRs du groupe II et III activeraient des mécanismes qui demeurent encore incunus, mais qui inhibent la formation d'adénylyl cyclase (Tanabe et al., 1992; Schoepp & Johnson, 1993; Cochilla & Alford, 1998). Des études immunologiques suggèrent que les mGluR1 seraient strictement post-synaptiques (Ryo et al., 1993). Chez les astrocytes isolés et *in situ* provenant de l'hippocampe, le groupe I des mGluRs a été identifié (Porter & McCarthy, 1995; Cai & Kimelberg, 1997; Shelton & McCarthy, 1999). Récemment, il a été démontré que le sous-type mGluR5 du groupe I serait prédominant chez les astrocytes (Cai et al., 2000).

6. LES INTERACTIONS NEURONE-GLIE DANS L'HIPPOCAMPE

Dans les tranches d'hippocampe, l'application de glutamate et la stimulation des afférences induit généralement une réponse calcique chez les cellules gliales (Porter &

McCarthy, 1995, 1996; Shelton & McCarthy, 1999; Pasti et al., 1997), quoi qu'une absence de réponse au glutamate a été rapportée (Duffy & MacVicar, 1995). Une élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} chez les cellules gliales peut moduler l'activité des astrocytes, entre autres en activant des canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants (Quandt & MacVicar, 1986), la production d'oxyde nitrique (Murphy et al., 1993) et la propagation de vagues calciques (Finkbeiner, 1992), en plus d'influencer l'activité neuronale en libérant des neurotransmetteurs (Parpura et al., 1994; Bezzi et al., 1998). Par conséquent, l'identification des mécanismes calciques gliaux est importante à cause de l'influence du Ca^{2+} dans la modulation de divers fonctions gliales et neuronales (Finkbeiner, 1992).

Il est bien établi que l'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997) est nécessaire à l'induction de réponses calciques chez les cellules gliales. Toutefois, le rôle joué par les récepteurs glutamatergiques ionotropiques et les canaux calciques de type L demeure incertain (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998). Par exemple, une seule étude a rapporté des élévations calciques suivant l'application de NMDA chez les astrocytes *in situ* en présence de tétradotoxine (Porter & McCarthy, 1995). Quant aux canaux calciques de type L, leur présence chez les astrocytes demeure controversée, car bien que leur identification en culture ne semble faire aucun doute (MacVicar, 1984; MacVicar & Tse, 1988; MacVicar et al., 1991), leur présence *in situ* est appuyée par certains (Porter & McCarthy, 1995; Duffy & MacVicar, 1996), mais contestée par d'autres (Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998).

7.OBJECTIFS

Etant donné que peu d'études ont étudié les mécanismes calciques gliaux *in situ* et qu'il ne semble pas exister de consensus concernant les résultats obtenus, la présente étude vise à identifier les mécanismes responsables des réponses calciques induites chez les astrocytes par l'application locale de glutamate et l'activité synaptique. L'indicateur fluorescent de calcium perméable aux membranes, le fluo-3 AM, a été utilisé sur les astrocytes de tranches d'hippocampe chez le rat juvénile (13 à 17 jours post-nataux). Les variations de calcium induites par l'application locale de glutamate ou par la stimulation électrique des fibres collatérales de Schaffer ont été observées avec un microscope confocal au laser.

Nous avons, en un premier temps, examiné la contribution respective des récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques, ainsi que des canaux calciques de type L, aux réponses calciques induites par le glutamate chez les astrocytes. Une technique différente d'application du glutamate, l'application locale du glutamate, a été utilisée afin de reproduire plus fidèlement la libération synaptique du glutamate, par opposition à l'application par perfusion utilisée dans les études précédentes (Duffy and MacVicar, 1995; Porter & McCarthy, 1995; Shelton & McCarthy, 1999).

En un deuxième temps, nous avons examiné la contribution des récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques, ainsi que des canaux calciques de type L, aux réponses calciques induites par la libération physiologique de glutamate en stimulant les afférences neuronales, les fibres collatérales de Schaffer. Nous avons finalement varié la fréquence de stimulation des afférences, afin de déterminer le seuil d'activation neuronal requis pour l'induction de réponses calciques chez les astrocytes et pour observer l'effet d'une

augmentation de la fréquence de stimulation sur le patron spatio-temporel des élévations calciques induites chez les astrocytes.

**CHAPITRE II. COMMON AND DISTINCT MECHANISMS OF CA²⁺ RESPONSES
EVOKED IN GLIAL CELLS BY LOCAL APPLICATION OF GLUTAMATE VS BRIEF
TETANIZATION OF SCHAFFER COLLATERALS IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES.**

Isabelle Latour, Christine E. Gee, Richard Robitaille and Jean-Claude Lacaille*

Centre de Recherche en Sciences Neurologiques et Département de Physiologie,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

(Article soumis au journal "Hippocampus")

1. ABSTRACT

The mechanisms of Ca^{2+} responses evoked in hippocampal glial cells *in situ* by local application or synaptic release of glutamate, were studied in slices using the membrane permeant fluorescent Ca^{2+} indicator fluo-3 AM and confocal microscopy. Ca^{2+} responses induced by local application of glutamate were unaffected by the sodium channel blocker tetrodotoxin and were therefore due to direct actions on glial cells. Glutamate-evoked responses were significantly reduced by the L-type Ca^{2+} channel blocker nimodipine, the group I/II metabotropic glutamate receptor antagonist (S)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG), and the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist (\pm)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV). However, glutamate-induced Ca^{2+} responses were not significantly reduced by the non-NMDA receptor antagonist 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX). These results indicate that local application of glutamate increases intracellular Ca^{2+} levels in glial cells via the activation of L-type Ca^{2+} channels, NMDA receptors and metabotropic glutamate receptors. Brief (1 sec) tetanization of Schaffer collaterals produced increases in intracellular Ca^{2+} levels in glial cells that were dependent on the frequency of stimulation (≥ 50 Hz) and on synaptic transmission (abolished by tetrodotoxin). These Ca^{2+} responses were also antagonized by the L-type Ca^{2+} channel blocker nimodipine and the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG. However, the non-NMDA receptor antagonist CNQX significantly reduced the Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses, while the NMDA antagonist APV did not. Thus, these synaptically-mediated Ca^{2+} responses in glial cells involve the activation of L-type Ca^{2+} channels, group I/II metabotropic glutamate receptors and non-NMDA receptors. These findings indicate that increases in intracellular Ca^{2+} levels induced in glial cells by local glutamate application and

by brief tetanization of Schaffer collateral both share similar mechanisms (activation of L-type Ca^{2+} channels and group I/II metabotropic glutamate receptors) but also have distinct components (NMDA vs non-NMDA receptor activation, respectively). Therefore, neuron-glia interactions in rat hippocampus *in situ* involve multiple, complex Ca^{2+} -mediated processes that may not be mimicked by local glutamate application.

2. INTRODUCTION

Until recently, glial cells were mostly considered passive cells, fulfilling neuronal growth and supportive functions. These roles included promoting neuronal migration by providing physical support (Hatten, 1990), maintaining ionic homeostasis by regulating the extracellular concentration of potassium during neuronal activity (Orkand et al., 1966) and providing neurotransmitter clearance (Rothstein et al., 1996).

The privileged localization of glial cells, tightly surrounding synapses (Peters et al., 1976; Ventura & Harris, 1999) and neuronal membranes (Kuffler et al., 1984), led to the hypothesis that glial cells could directly affect neuronal function and modulate synaptic activity. Many findings support such an active role of glial cells. First, many receptors for neurotransmitters have been identified on glial cells of the central nervous system (CNS) (Kimelberg, 1995; Vernadakis, 1996; Porter & McCarthy, 1997) and glial cells respond to these neurotransmitters (McCarthy & Salm, 1991; Shao & McCarthy, 1994; Porter & McCarthy, 1995; Duffy & MacVicar, 1995; Cai & Kimelberg, 1997). Second, glutamate or neuronal stimulation raises intracellular calcium levels in CNS glial cells (Cornell-Bell et al., 1990; Smith, 1992; Porter & McCarthy, 1995; Porter & McCarthy, 1996; Cai & Kimelberg, 1997; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998; Shelton & McCarthy, 1999). Furthermore, intracellular calcium oscillations, spreading like waves across glial cells, have been reported in glial cells in culture (Cornell-Bell et al., 1990; Smith, 1992; Dani et al., 1992; Venance et al., 1997; Harris-White et al., 1998) and *in situ* (Pasti et al., 1997). These calcium waves are considered a form of intercellular communication (Smith, 1992) and have been shown to efficiently modulate synaptic

activity (Hassinger et al., 1995; Pfrieder & Barres, 1997; Pasti et al., 1997; Keyser & Pellmar, 1997; Newman & Zahs, 1998; Kang et al., 1998; Araque et al., 1998a; Araque et al., 1999).

CNS glial cells *in situ* also respond with increases in intracellular Ca^{2+} levels to glutamate application (Porter & McCarthy, 1995; Shelton & McCarthy, 1999) and synaptic activity (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998). The types of ionotropic and metabotropic glutamate receptors, as well as Ca^{2+} channels, involved in these Ca^{2+} responses have been described for glial cells in culture (Mac Vicar, 1984; MacVicar & Tse, 1988; Cornell-Bell et al., 1990; MacVicar et al., 1991; McCarthy & Salm, 1991; Shao & McCarthy, 1994; Steinhäuser & Gallo, 1996; Verkhratsky & Kettenman, 1996; Cai & Kimelberg, 1997). However, the responsiveness of glial cells in culture to transmitters, as well as the underlying mechanisms, differ from those of glial cells *in situ* or acutely isolated (Cai & Kimelberg, 1997; Kimelberg et al., 1997). Indeed, despite a general consensus that glutamate application and neuronal stimulation induces intracellular calcium rises in glial cells in hippocampal slices (Porter & McCarthy, 1995, 1996; Shelton & McCarthy, 1999; Pasti et al., 1997), a lack of glutamate responsiveness has also been reported (Duffy & MacVicar, 1995). In addition, the implication of voltage-dependent calcium channels in the glutamate-induced calcium responses (MacVicar, 1984; MacVicar & Tse, 1988; MacVicar et al., 1991; Porter & McCarthy, 1995; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998) and the respective contribution of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in the stimulation-induced calcium responses (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997) also remains controversial for glial cells *in situ*.

To directly assess the role of glutamate-mediated mechanisms in the glial cell responses, we examined the Ca^{2+} responses elicited by local application of glutamate in an attempt to mimic more faithfully the synaptic release of glutamate than the bath application of ligands that

was used in previous studies (Duffy and MacVicar, 1995; Porter & McCarthy, 1995; Pasti et al., 1997; Shelton & McCarthy, 1999). In addition, to address the mechanisms that contribute to the responses of hippocampal glial cells to synaptic activity *in situ*, we characterized the Ca^{2+} responses evoked by Schaffer collateral stimulation using the membrane-permeant fluorescent Ca^{2+} indicator fluo-3 AM and confocal microscopy in rat hippocampal slices, and examined the contribution of voltage-dependent calcium channels and different types glutamate receptors to these responses. Our results suggest that L-type calcium channels and metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in both glutamate- and stimulation-induced Ca^{2+} responses, whereas N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors contribute significantly to glutamate-evoked responses, while non-NMDA glutamate receptors contribute to stimulation-induced responses.

3. MATERIALS AND METHODS

Hippocampal slices

Transverse hippocampal slices were obtained from young (13-17 days) male Sprague-Dawley rats (Charles River, Montreal) as described previously (Carmant et al., 1997). Briefly, rats were anesthetized with halothane and decapitated with a guillotine. The brain was rapidly excised and placed in cold (4°-5°C) oxygenated (95% O_2 /5% CO_2) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 MgSO_4 , 2 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 10 glucose and 50 μM Trolox. A block of tissue containing the hippocampus was prepared and transverse hippocampal slices (300 μm thickness) were obtained in ACSF at 4°C using a

vibratome (Campden Instruments). Slices were transferred to a container filled with oxygenated ACSF at room temperature and allowed to recover for one hour.

Confocal microscopy and Ca^{2+} imaging

Cells were loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo3-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) as described previously (Carmant et al., 1997). Slices were incubated for one hour at 37°C in oxygenated ACSF containing 30 μM fluo 3-AM, 0.5% dimethyl sulphoxide and 0.02% pluronic acid (Molecular Probes). After the incubation period, slices were returned to oxygenated ACSF at room temperature for at least one hour. For individual experiments, a slice was placed in a chamber mounted on the stage of an upright laser scanning confocal microscope (Olympus BH5 and BioRad MRC-600). The slice was submerged and continuously perfused with oxygenated ACSF (1-2 ml/min). Using confocal microscopy and a 40x long-range water-immersion objective, fluorescent glial cells were visually identified in stratum radiatum of the CA1 region based on their small soma diameter ($\sim 10\mu\text{m}$) and their dispersed distribution. The 488nm excitation line of the laser was attenuated to 1% of maximum power, and emission was detected through a low-pass emission filter with cut-off at 515 nm. Similar ranges of gain (9-10) and black level (4.7-5.3) were used throughout experiments to standardize Ca^{2+} responses. For Ca^{2+} imaging, time-lapse fluorescent images were collected every 0.645s and recorded using MPL software (BioRad). The images were further analyzed off-line using Cfocal software (kindly provided by Dr M.P. Charlton, University of Toronto). For each time-lapse image, the fluorescence intensity (F) was averaged over the soma area. One hundred to three hundred control images were taken prior to glutamate application; twenty prior to electrical stimulation.

Changes in fluorescence (ΔF) induced by glutamate electrical stimulation, were measured as relative changes from baseline fluorescence and expressed as

$$\% \Delta F/F = [(F_{\text{post}} - F_{\text{rest}})/F_{\text{rest}}] \times 100$$

For each Ca^{2+} response, the peak amplitude and the area under the response, calculated using a trapezoidal rule-based algorithm (SigmaPlot), were determined.

Glutamate was applied locally using a patch micropipette (tip diameter $<2\mu\text{m}$) filled with ACSF containing $500\mu\text{M}$ L-glutamic acid (Sigma). The pipette was positioned, under visual control, near an identified glial cell. Fluorescence measurements were taken from cells located within approximately $100\mu\text{m}$ from the pipette tip. Glutamate was applied by micropressure (10-20ms; 20-25psi) using a Picospritzer (Medical Systems, Greenvale, NY). Cells usually responded to glutamate application with responses $>50\%$ $\Delta F/F$ and with a latency of $\sim 3\text{s}$. Therefore, an arbitrary threshold of 10% $\Delta F/F$ and onset latency $<6.45\text{s}$ was set for selecting responsive cells. In addition, cells in which the Ca^{2+} response did not recover to baseline were discarded from the analysis.

Electrophysiology

An ultra-small concentric bipolar electrode (Frederick Haer & Co., Brunswick, ME) was placed in stratum radiatum for electrical stimulation of Schaffer collaterals ($100\text{-}900\mu\text{A}$, single pulses, $50\text{-}65\mu\text{s}$ duration). A micropipette filled with ACSF was positioned in the CA1 pyramidal cell layer to record field potentials using an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments Inc., USA) in bridge mode. Ca^{2+} responses were evoked by 5-100 Hz trains (1s duration) and were monitored in glial cells located in stratum radiatum $\sim 200\mu\text{m}$ away from the stimulation electrode.

For patch-clamp recordings, pipettes were pulled from borosilicate glass (1mm O.D., A-M Systems) and filled with (in mM) 145 K-methylsulfate, 1 MgCl₂, 8 NaCl, 2 ATP, 0.4 GTP, 10 HEPES, 1 EGTA, 0.15% biocytin and 10-20μM Oregon green BAPTA-I (Molecular Probes) titrated with KOH to pH 7.2-7.25 and adjusted to 275-285mOsm (electrode resistance 4-8MΩ). Whole-cell recordings were obtained from glial cells using visible light illumination from an area of stratum radiatum where fluorescent glial cells were identified using confocal microscopy. Current-clamp recordings were made using an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments) in bridge mode. Signals were filtered at 1KHz, digitized at 2KHz (TL-1 Axon Instruments), stored on a PC and analyzed using pClamp software. The bridge balance was regularly monitored and adjusted using the bridge circuit.

Histology

After whole-cell recordings, slices containing biocytin-filled cells were transferred to a freshly prepared solution of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer and fixed for 4-12 hours at 4°C. Slices were washed and stored in 0.1M phosphate buffer for up to two weeks, then embedded in agarose and resectioned at 50-80μm thickness with a vibratome. The sections were then processed using the Vectastain ABC kit (Vecta Laboratories, Burlingame CA) followed by nickel-intensification as previously described (Woodhall et al., 1999). Sections were then mounted in DPX and examined under a light microscope.

Drugs

Chemicals were purchased from Sigma, unless indicated otherwise. Stock solutions were prepared of the NMDA antagonist (±)2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV; 7.7mM), the non-NMDA antagonist 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX; 2mM; Tocris-Cookson,

Baldwin, MO), the group I/II mGluR antagonist (S)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG; 19mM; Tocris-Cookson, Baldwin, MO) and the L-type Ca^{2+} channel blocker nimodipine (200 μM ; Research Biochemical International), and were stored frozen. On the day of the experiment, antagonists were diluted in ACSF to their final concentration (50 μM APV, 20 μM CNQX, 500 μM MCPG, and 2-4 μM nimodipine) and applied by perfusion. The Na^+ channel blocker tetrodotoxin (TTX; 775nM) was freshly prepared.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between groups was assessed using one-way ANOVA for differences between three or more groups, and using Student's t-tests or paired t-tests for differences between two groups. The level of significance was set at $p < 0.05$. When normality and variance tests failed, appropriate non-parametric tests (indicated in text) were performed. SigmaStat statistical software (SPSS) was used for all statistical tests. All measures are expressed as mean \pm SEM.

4. RESULTS

Glial cell identification

Glial cells and interneurons were loaded by the calcium indicator fluo-3 AM using our procedure (eg. Carmant et al., 1997). In stratum radiatum, labelled glial cells outnumbered interneurons, and were distinguished by their small soma size ($\sim 10\mu\text{m}$) and their widely dispersed distribution. To confirm that the selected cells were glial cells, whole-cell current-clamp recordings were obtained from a sample of cells selected using the above criteria ($n=6$;

Fig. 1A). Consistent with known electrophysiological characteristics of glial cells, these cells had a highly negative resting membrane potential (-71 ± 2.2 mV), a low input resistance (19 ± 6.6 M Ω) and did not fire action potentials following large depolarizing current injections (Fig. 1B). In contrast, whole cell recordings obtained from visually identified interneurons in the same layers showed typical neuronal properties (Fig. 1D). Furthermore, visualization of biocytin-filled cells following whole-cell recording from single glial cells revealed an extensive network of labelled glial cells (Fig. 1C), as previously reported (D'Ambrosio et al., 1998). These results suggest that the fluo3-AM labelled cells selected using our criteria were glial cells.

Ca²⁺ responses evoked by local application of glutamate

The effects of local application of glutamate on glial cells labelled with the fluorescent Ca²⁺ indicator fluo-3 AM was first examined in normal ACSF. Glutamate evoked transient increases in fluorescence in labelled cells (Fig 2A,B). These responses, reflecting rises in intracellular Ca²⁺ levels, lasted seconds. In 22 cells examined (n=11 slices), the mean peak amplitude of glutamate-evoked Ca²⁺ responses was $174 \pm 13\%$ $\Delta F/F$ and the mean area under the response was $1403 \pm 164\%$ $\Delta F/F \times s$. These Ca²⁺ responses were unlikely due to mechanical stimulation of the cells, since similar local application of ACSF alone failed to evoke Ca²⁺ responses (n=20 cells; data not shown).

Glutamate-evoked Ca²⁺ responses were stable over time and could be reliably induced in the same cells by repeated glutamate applications at 15-30 min intervals (Fig. 3A). The mean peak amplitude and area under the Ca²⁺ response were not significantly different between a first glutamate application and subsequent applications 15 and 45 min later (n=22 cells; ANOVA,

$p > 0.6$; Figure 3C). The stability of the glutamate-evoked Ca^{2+} responses allowed comparisons in different pharmacological conditions in the same cell.

To evaluate if glutamate-evoked responses involved direct or indirect actions of glutamate on glial cells, tetrodotoxin (TTX) was used to block voltage-dependent Na^+ channels and activation of neurons by glutamate. Glutamate-evoked Ca^{2+} responses were unaffected during bath application of 775nM TTX (Fig. 3B). The mean peak amplitude and area under the Ca^{2+} response were not significantly different in control ACSF and TTX ($n=12$ cells; Student's paired t-tests, $p > 0.8$; Fig. 3C). These results suggest that the glutamate-evoked Ca^{2+} responses were due to direct actions of glutamate on glial cells. Glutamate-evoked Ca^{2+} responses were therefore further characterized in the presence of TTX. Three different types of Ca^{2+} responses were observed. In almost all cells examined (99/108 cells), local glutamate application evoked a transient, monophasic increase in intracellular Ca^{2+} levels (Fig. 4A) with a mean onset latency of 3.5 ± 0.14 s, peak amplitude of $145 \pm 5\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ and area under the response of $1213 \pm 75\%$ $\Delta\text{F}/\text{F} \times \text{s}$. In a small proportion of cells (9/108), glutamate-evoked responses consisted of an initial rise in Ca^{2+} levels followed by a sustained plateau (Fig. 4B) with a mean peak amplitude of $191 \pm 24\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ and area under the response of $7908 \pm 1294\%$ $\Delta\text{F}/\text{F} \times \text{s}$. Cells with plateau type of glutamate-evoked responses (area under Ca^{2+} response $>4000\%$ $\Delta\text{F}/\text{F} \times \text{s}$), because of their rare occurrence, were excluded from further analysis. Finally, in some cells ($n=10$), spontaneous repetitive increases in intracellular Ca^{2+} levels were observed during the control period (before glutamate application) (Fig. 4C). Because spontaneous responses sometimes overlapped in time with evoked responses, these cells were also excluded from further analysis. In 2 cells with spontaneous Ca^{2+} responses, these responses were observed prior to placement of the drug

micropipette in the slice. Therefore, these spontaneous Ca^{2+} responses were unlikely to have been caused by mechanical stimulation of glial cells during placement of the micropipette.

Mechanisms of glutamate-evoked responses

The mechanisms underlying Ca^{2+} responses evoked by glutamate were next examined in the presence of TTX. Control experiments were first performed to verify that repeated glutamate applications evoked stable Ca^{2+} responses in TTX. In 27 cells tested, the mean peak amplitude and area under Ca^{2+} responses evoked by three successive applications of glutamate were not significantly different (Fig. 5A,D; one-way ANOVA, $p>0.7$).

Since non-NMDA and NMDA receptors have been reported in acutely isolated and *in situ* hippocampal glial cells (Jabs et al., 1994; Porter & McCarthy, 1995; Seifert et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Shelton & McCarthy, 1999), their contribution to glutamate-evoked Ca^{2+} responses was determined using the non-NMDA and NMDA antagonists, CNQX and APV respectively. In 13 cells ($n=10$ slices), the mean peak amplitude and area under Ca^{2+} responses in the presence of $20\mu\text{M}$ CNQX were not significantly different from control (Fig. 5B and D; Student's paired t-tests, $p>0.6$). The lack of effect of CNQX was not due to an ineffective antagonism of non-NMDA receptors since synaptically-evoked field potentials in CA1 pyramidal cells were blocked by this concentration of CNQX (eg. Figure 10). These results suggest that Ca^{2+} responses produced in glial cells by local glutamate application did not involve non-NMDA glutamate receptors.

In contrast, NMDA receptors appeared involved in glutamate-evoked responses. In 30 cells tested ($n=18$ slices), the mean peak amplitude of Ca^{2+} responses was significantly reduced by 10% (Student's paired t-test, $p<0.05$) and the area under the response by 22% (Wilcoxon

signed rank test, $p < 0.05$) in the presence of $50\mu\text{M}$ APV (Figure 5C and D). The APV effects were reversible, and Ca^{2+} responses recovered to control level in 9 cells tested (Figure 5C and D; Student's paired t-test, $p > 0.6$). Hence, NMDA receptors contributed significantly to glutamate-evoked Ca^{2+} responses.

Metabotropic glutamate receptors have also been reported in acutely isolated and *in situ* hippocampal glial cells (Porter & McCarthy, 1995; Pasti et al., 1997; Cai & Kimelberg, 1997; Carmignoto et al., 1998; Shelton & McCarthy, 1999). Therefore, the effects of the group I/II mGluR antagonist MCPG ($500\mu\text{M}$) on glutamate-evoked Ca^{2+} responses was also investigated. In 12 cells tested (6 slices), the group I/II mGluR antagonist significantly reduced Ca^{2+} responses, and in some cells completely blocked them (for example Figure 6B). In the presence of MCPG, the mean peak amplitude and area under Ca^{2+} responses were significantly reduced by 49% and 77% respectively (Figure 6C; Student's paired t-tests, $p < 0.05$). The antagonistic effects of MCPG were reversible and glutamate-evoked responses recovered to baseline levels following a 30 min washout in TTX (Figure 6B and C; $n=5$ cells, Student's paired t-tests, $p > 0.2$). These results indicate that group I/II mGluRs contribute markedly to the glutamate-evoked intracellular Ca^{2+} elevations.

Previous studies reported the presence of voltage-dependent calcium channels in hippocampal glial cells *in situ* (Porter & McCarthy, 1995; Duffy & MacVicar, 1996). We examined their contribution to glutamate-evoked Ca^{2+} responses using the L-type Ca^{2+} channel antagonist nimodipine. Glutamate-evoked Ca^{2+} responses were partially blocked in the presence of $2\text{-}4\mu\text{M}$ nimodipine (Fig. 6A). In 17 cells tested (11 slices), the mean peak amplitude was significantly reduced by 18% (paired Student t-test, $p < 0.05$) and the area under the Ca^{2+} response by 30% (Fig. 6C; paired Student t-test, $p < 0.05$ one-tailed). The partial block by nimodipine was

reversible after a 30 min washout of the antagonist (Figure 6A and C; n=14 cells, paired Student t-test, $p > 0.1$). These results indicate that voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels are partly involved in glutamate-evoked Ca^{2+} responses in glial cells.

Ca^{2+} responses evoked by stimulation of Schaffer collaterals

To assess if synaptically released transmitter produces similar responses in glial cells, Schaffer collaterals were electrically stimulated in stratum radiatum. First, the intensity of single pulse stimulation was adjusted to evoke a field potential and population spike in stratum pyramidale (Figure 7B). A 1sec 100 Hz train was then given at this intensity and fluorescence changes examined in fluo-3 AM labelled glial cells in stratum radiatum. Schaffer collateral stimulation evoked increases in intracellular Ca^{2+} levels in 44% of glial cells (58 cells in 18 slices; Figure 7A and B). Compared to Ca^{2+} responses evoked by glutamate in ACSF, Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses displayed a significantly smaller mean peak amplitude ($125 \pm 8\% \Delta F/F$, Student t-test, $p < 0.05$) and area under the response ($538 \pm 62\% \Delta F/F \times s$, Mann-Whitney Rank sum test, $p < 0.05$). Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses were of the transient monophasic type; plateau type Ca^{2+} responses were not observed. Spontaneous oscillations in intracellular Ca^{2+} levels were observed in eleven glial cells, which were not considered any further.

Since direct electrical stimulation of glial cells in culture evokes intracellular Ca^{2+} rises (Nedergaard, 1994; Araque et al., 1998b), we used the Na^+ channel blocker tetrodotoxin to verify that stimulation-evoked Ca^{2+} responses were due to activation of Schaffer collaterals. In the presence of TTX, stratum radiatum-evoked field potentials were blocked (Figure 8A). In addition, tetanization of stratum radiatum did not evoke Ca^{2+} responses in any glial cells

examined in the presence of TTX (n=27 cells in 4 slices; Figure 8A). The block of synaptically-evoked field potentials and Ca^{2+} responses by TTX was reversible. After a 30 min washout in ACSF, field potentials and Ca^{2+} responses were evoked by stratum radiatum stimulation in previously unresponsive slices (Figure 8B). The mean peak amplitude and area under Ca^{2+} responses in these cells (n=7 cells in 2 slices) were similar to those evoked in the group of cells in ACSF (Student t-test, $p>0.4$). These results indicate that Ca^{2+} responses evoked in glial cells by stratum radiatum stimulation involve activation of Schaffer collaterals and not direct stimulation of glial cells.

Frequency-dependence of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses

To examine if Ca^{2+} responses evoked by Schaffer collateral stimulation were frequency-dependent, 1 sec trains of stimulation were applied at different frequencies (5, 25, and 50Hz). With stimulation at 5 and 25Hz, Ca^{2+} responses were not observed (Figure 9A and B). However, at a stimulation frequency of 50Hz, Ca^{2+} responses were observed in 59% of glial cells (n=20 cells). The mean peak amplitude and area under these Ca^{2+} responses were not significantly different from those of responses evoked by 100Hz stimulation (Figure 9A and B, Student t-tests, $p>0.3$). These results indicate that Schaffer collateral-evoked rises in intracellular Ca^{2+} levels in glial cells are frequency-dependent and are recruited at activation rates of 50Hz or more.

Mechanisms of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses

Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses exhibited some rundown with repeated stimulation (data not shown), in contrast to glutamate-evoked Ca^{2+} responses. Therefore, to examine the mechanisms involved in stimulation-evoked responses, responses obtained in different pharmacological conditions were compared to responses obtained in the control group

described above (100 Hz stimulation in ACSF; n=58 cells in 18 slices; Figure 10 A and D). We examined the contributions of ionotropic glutamate receptors to Schaffer collateral-evoked responses using NMDA and non-NMDA antagonists. In the presence of the NMDA antagonist APV (50 μ M), single pulse stimulation of Schaffer collaterals evoked field potentials similar to those in control ACSF (Fig. 10C). Tetanization of Schaffer collaterals elicited Ca²⁺ responses in 51% of glial cells examined in APV (n=44 cells in 11 slices; Figure 10C and D). The incidence of responsive cells in APV (mean number of responsive cells per slice) was not significantly different from that in ACSF (Figure 11C). The mean peak amplitude and area under Ca²⁺ responses in APV were not significantly different from those of responses elicited in ACSF (Figure 10C and D; Multiple comparisons on ranks versus control group, Dunn's method, p>0.05). These results indicate that Schaffer collateral-evoked Ca²⁺ responses in glial cells do not involve NMDA receptors.

The role of non-NMDA receptors in Schaffer collateral-evoked Ca²⁺ responses was then investigated during application of the non-NMDA antagonist, CNQX (20 μ M). Field potentials evoked by single pulse stimulation were completely blocked in all slices tested in the presence of CNQX (Figure 10B). In contrast, tetanization of Schaffer collaterals in CNQX evoked Ca²⁺ responses in 44% of glial cells. This incidence of responsive cells was not significantly different from that in control ACSF (Fig. 11C). The Schaffer collateral evoked Ca²⁺ responses, however appeared smaller (Figure 10B). The mean peak amplitude and area under Ca²⁺ responses were significantly reduced by 40 and 60%, respectively, in CNQX (Multiple comparisons on ranks versus control group, Dunn's method, p<0.05; Figure 10B and D). These results indicate that

non-NMDA receptors contribute to Schaffer collateral-evoked rises in intracellular Ca^{2+} levels in glial cells.

To examine the contributions of mGluRs in Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses, the group I/II mGluR antagonist MCPG was used. In four slices examined, single pulse stimulation of Schaffer collaterals evoked a field potential and a population spike, as in control ACSF (Figure 11B). However, tetanization of Schaffer collaterals failed to evoke Ca^{2+} responses in all but one of 30 glial cells examined (Figure 11B and C). This low incidence of responsive glial cells in MCPG (mean number of cells responding per slice) was significantly smaller than that of cells in control ACSF (Figure 11C). This nearly complete block of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses in glial cells by MCPG indicates that group I/II mGluRs play an important role in these responses.

Finally, we determined the role of L-type Ca^{2+} channels in Ca^{2+} responses evoked by Schaffer collateral tetanization using nimodipine. Field potentials elicited by single pulse stimulation of Schaffer collaterals, in slices exposed to nimodipine, were similar to those in slices in ACSF (Figure 11A). In contrast, tetanization of Schaffer collaterals in the presence of $2\mu\text{M}$ nimodipine evoked Ca^{2+} responses in only 2% of the cells examined (1 of 44 cells in 6 slices) (Figure 11A and C). This low incidence of responsive cells in nimodipine was significantly smaller than that in normal ACSF (Figure 11 C). This near total block by nimodipine suggests that L-type Ca^{2+} channels are activated and participate importantly in Ca^{2+} responses of glial cells evoked by Schaffer collateral tetanization.

To verify that the block of Ca^{2+} responses by the antagonists nimodipine and MCPG were not artefactual, similar experiments were performed using their vehicle solutions, ethanol (18

cells in 5 slices) and NaOH (18 cells in 3 slices) respectively. Field potentials and Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses were unaffected in these solutions. No significant differences were observed in the mean peak amplitude and area under the response for Ca^{2+} responses evoked in these vehicle solutions relative to responses in normal ACSF (ANOVA, $p > 0.1$; data not shown).

5. DISCUSSION

In this study, the glutamate-dependent mechanisms involved in neuron-glia interactions in the rat hippocampus were investigated using Ca^{2+} imaging and confocal microscopy. Our results indicate that common mechanisms are responsible for the production of glutamate- and synaptically-induced Ca^{2+} responses in glial cells, that is, metabotropic glutamate receptors and L-type Ca^{2+} channels activation. However, our results also indicate that the involvement of ionotropic glutamate receptors differs in the two conditions where NMDA receptors partly mediated glutamate-induced Ca^{2+} rises, while non-NMDA receptors significantly contributed to glial Ca^{2+} responses induced by synaptic activity. Hence, these results indicate that the activation of glial cells results in complex Ca^{2+} -dependent phenomena and that experimental approaches mimicking best physiological conditions must be used to study neuron-glia interactions.

Homogeneity of glutamate-induced Ca^{2+} rises in CA1 glial cells

We observed that brief and local applications of glutamate evoked rapid transient Ca^{2+} responses in glial cells and could be elicited repetitively by multiple local applications. This is by far the dominant type of responses observed while sustained or oscillatory Ca^{2+} responses were rarely observed. These results differ with the observations published earlier in studies using non-cultured (*in situ* or acutely isolated) hippocampal glial cells where prolonged Ca^{2+} elevations and short oscillations were generally reported (Porter & McCarthy, 1995; Cai & Kimelberg, 1997; Shelton & McCarthy, 1999).

There are a number of possible explanations for this discrepancy. A first possibility might be that the cells that we studied were not glial cells. However, this is quite unlikely owing that our criteria of selection (i.e., cell size and shape, as well as their distribution within the

hippocampus) were confirmed by distinctive morphological and electrophysiological characteristics determined following patch-clamp recordings and biocytin labelling of the cells. A key feature was the presence of a large syncytium of cells following whole-cell recordings of one presumed glial cell. This is a typical and unique feature of glial cells and, in particular, astrocytes in rat hippocampus (D'Ambrosio et al., 1998). Second, it could be attributed to the diversity of glial cell properties. Indeed, there is now evidence that the pharmacological (McCarthy & Salm, 1991; Shao & McCarthy, 1994; Duffy & MacVicar, 1995), electrophysiological and biochemical (Walz and Lang, 1998) properties of glial cells (McKhann II et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998) are diverse. According to this scenario, the uniformity of the responses observed in our study implies that we would have studied systematically the same type of cells based on our criteria of identification and selection. However, this possibility is unlikely since our criteria do not differ from those used in other studies. A third possibility might be that Ca^{2+} responses were evoked in glial cells by mechanical disturbance made by the micropipette or the ejection of solution from the pipette since there is evidence that Ca^{2+} rises in glial cells can be elicited by mechanical stimuli (Newman & Zahs, 1998; Araque et al., 1998). However, this is unlikely since monophasic Ca^{2+} responses were never observed following local application of ACSF. Finally, a fourth possibility may be related to the different methods of application. Indeed, studies of glial cells Ca^{2+} responses to glutamate have always been performed using prolonged bath application of agonists whereas in the present work we used brief and local applications. The physiological consequences of these methods are for more than just technical. For instance, bath applications will produce a widespread and diverse activation of glutamate-dependent mechanisms in many different cell types, and may thus involve in addition other, non-glutamatergic, mechanisms activated as a consequence of the widespread

application. Also, bath applications will produce a gradual action owing to the time required for the perfused agonist solution to reach equilibrium in the bath. Moreover, prolonged bath applications of agonists may lead to desensitization of receptors resulting in a differential activation of the various receptors causing the activation of different glial mechanisms (Verkhatsky & Kettenman, 1996). Therefore, bath application promotes activation of many mechanisms and different cell types, and hence might induce the release of numerous substances. Local glutamate application, however, restrains the amount of glutamate, the duration of its application and the affected area. Hence, this mode of application simulates more accurately the way glutamate is naturally released by synaptic terminals.

Involvement of L-type Ca^{2+} channels

Our results suggest a large contribution of L-type Ca^{2+} channels to glutamate- and stimulation-induced Ca^{2+} responses. The identification of L-type Ca^{2+} currents has been demonstrated in astrocyte cultures (MacVicar, 1984; MacVicar & Tse, 1988; MacVicar et al., 1991), acutely isolated astrocytes (Barres et al., 1990; Duffy & MacVicar, 1994) and *in situ* (Porter & McCarthy, 1995; Duffy & MacVicar, 1996). However, it has been argued that the inhibition of astrocytic Ca^{2+} rises observed in glial cells *in situ* in the presence of L-type Ca^{2+} channel antagonists reflects an indirect effect of partial inhibition of neuronal glutamate release (Carmignoto et al., 1998). However, in our study, glutamate-induced Ca^{2+} responses were not affected by the presence of TTX. This indicates that glial Ca^{2+} responses are not dependent on the level of neuronal depolarization required for the optimal activation of the neuronal pool of L-type Ca^{2+} channels. Furthermore, nimodipine strongly affected the Ca^{2+} responses induced by nerve stimulation even though the size and shape of field potentials were not affected. This

indicates that the blockade of the glial Ca^{2+} responses cannot be explained by a reduction in synaptic transmission. Hence, our results indicate that glial L-type Ca^{2+} channels contribute directly to Ca^{2+} responses induced by glutamate and that they are involved in the stimulation-induced glial Ca^{2+} responses.

Involvement of metabotropic glutamate receptors in glial Ca^{2+} responses

The characteristic and type of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in cultured and non-cultured glial cells are believed to be similar. In general, it is reported that glial cells are equipped with non-NMDA (Backus et al., 1989; Cornell-Bell et al., 1990; Jensen & Chiu, 1991; Jabs et al., 1994; Porter & McCarthy, 1995; Steinhauser & Gallo, 1996; Seifert et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Shelton & McCarthy, 1999) as well as metabotropic receptors and are believed to be lacking NMDA receptors (Porter & McCarthy, 1995; Steinhäuser & Gallo, 1996; Pasti et al., 1997; Cai & Kimelberg, 1997; Carmignoto et al., 1998; Shelton & McCarthy, 1999). Our results also stress the importance of the metabotropic receptors in the regulation of Ca^{2+} in glial cells as indicated by the large reduction of Ca^{2+} responses by the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG. This supports previous findings which identified functional mGluRs in non-cultured hippocampal glial cells. Field potentials were not significantly affected by nimodipine or MCPG, indicating that it is unlikely that the blockade of Ca^{2+} responses was an indirect consequence of a decrease of synaptic activity and probably represents a direct effect on glial mGluRs and L-type Ca^{2+} channels. This assumption is further supported by our observation that MCPG and nimodipine considerably reduced glutamate-induced Ca^{2+} rises when synaptic activity was already blocked by TTX.

Role of non-NMDA ionotropic glutamate receptors in glial Ca^{2+} responses.

Consistent with previous studies, our results show that non-NMDA ionotropic receptors are necessary for a full synaptic activation of glial cells. This may be caused by the direct effect of the non-NMDA antagonist on glial cell receptors or indirectly by the reduction of neuronal activity as revealed by a blockade of the field EPSPs. Our results support the possibility that glial non-NMDA receptors are involved. Indeed, although CNQX reduced the size of stimulation-induced Ca^{2+} increases it did not impair the ability of the glial cells to respond as indicated by the fact that the percentage of responsive cells was unchanged. Thus, post-synaptic non-NMDA activity appears important since the size of the responses were significantly reduced but it is certainly not necessary for the activation of glial cells.

Unlike most reports, Ca^{2+} responses elicited by local application of glutamate were not affected by the presence of the non-NMDA antagonist CNQX. The differences may be related to the techniques used. Studies identifying non-NMDA glial receptors used bath-application of selective agonists whereas we used local application of glutamate in the presence of specific antagonists. Bath application of agonists will produce a widespread activation of several neuronal and glial elements resulting in a non-specific activation of multiple and complex glutamatergic mechanisms. Moreover, using this approach, it is difficult to distinguish between the activation of neuronal and glial receptors, unless TTX is also applied by perfusion. Moreover, glutamate is the endogenous neurotransmitter and the use of antagonists reflects more closely the contribution of the different receptors present *in situ*. In addition, local and brief application of glutamate is more likely to be better controlled by the powerful glutamate uptake mechanisms in comparison to a massive and prolonged application of agonists. Moreover, since

non-NMDA receptors have a lower affinity for glutamate than NMDA receptors, brief and superficial applications of glutamate would preferentially activate NMDA receptors.

Role of NMDA glutamate receptors in glial Ca^{2+} responses.

Our results indicate that NMDA receptors contribute to the glutamate-induced but not the stimulation-induced glial Ca^{2+} responses. It is generally believed that glial cells do not possess NMDA receptors since NMDA-induced Ca^{2+} responses were not observed in hippocampal glial cells from mature rats (Shelton & McCarthy, 1999) and, when observed, they were attributed to indirect glutamate release following neuronal receptors activation, because it was often antagonized by TTX (Shao & McCarthy, 1997). However, the presence of glial cells sensitivity to NMDA appears to be related to the age of the preparation, hence to the developmental stage. Indeed, TTX-resistant NMDA-induced Ca^{2+} responses were reported in glial cells *in situ* of young rats hippocampal slices (< 12 day old rats; Porter & McCarthy, 1995). This suggests that NMDA receptors could play a developmental role and that their expression, or functional implication, could be down-regulated with age. In the present study, the involvement of NMDA receptors in glutamate-induced but not in synaptic-induced glial Ca^{2+} responses (see also below) may indicate that hippocampal glial cells of 13-17 day old rats are at a turning point where the receptors are still expressed by the cells but are not used in physiological conditions. Consistent with this possibility is the observation that NMDA-induced currents recorded in glial cells of rat spinal cord gradually decline during development (Ziak et al., 1998).

Functional properties of glial Ca^{2+} responses evoked by Schaffer collateral stimulation

Our results demonstrate the existence of neuron-glia interactions as revealed by the induction of Ca^{2+} elevations in glial cells evoked by Schaffer collateral stimulation. These results

are consistent with the few studies which demonstrated that cultured (Dani et al., 1992) and *in situ* (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999) glial cells respond by a Ca^{2+} increase to synaptic activity. Similarly to responses induced by local applications of glutamate, Ca^{2+} responses were transient and no prolonged or oscillatory responses were observed. This indicates that local application of glutamate mimics physiological transmitter release (i.e. brief and high level of neurotransmitter).

The active contribution of glial cells in the regulation of neuronal functions will be directly related to the properties of their responses and their sensitivity to synaptic activity. In the present study, we found that no Ca^{2+} responses could be elicited with stimulation frequency of 25 Hz or less. This indicates that a high level of glutamate is required to activate Ca^{2+} -dependent mechanisms in glial cells. This is consistent with other published observations where Ca^{2+} responses were observed only with sustained stimulation at moderate frequency (Dani et al., 1992) or with brief and intense stimuli (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997).

Another important characteristic of the stimulation-induced responses is the rundown of Ca^{2+} responses elicited by successive trains of stimuli. This indicates that Ca^{2+} -dependent glial mechanisms that might be involved in neuron-glia interactions will only be recruited initially. It is unlikely that the rundown was due to receptor desensitization since repeated local glutamate applications induced similar Ca^{2+} responses. Interestingly, Ca^{2+} responses induced by local application of glutamate are significantly larger than the responses elicited by nerve stimulation, suggesting that additional elements are involved in the production of the stimulation-induced glial Ca^{2+} responses. A possible explanation is that other neurotransmitters are likely to be released along with glutamate during high frequency stimulation. For instance neurotransmitters such as peptides, ATP or adenosine could be released from the same nerve terminals as co-

transmitters (Jonzon & Fredholm, 1985). In addition, stimulation of Schaffer collaterals will activate other non-glutamatergic neuronal elements, in particular, GABAergic interneurons. The release of GABA during nerve stimulation may well contribute to the production of Ca^{2+} responses in glial cells and the resulting neuron-glia interactions since hippocampal glial cells possess GABA_A receptors that cause Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels (Fraser et al., 1995).

Functional implications for neuron-glia interactions

The results presented in this study as well as from others clearly present glial cells as active elements that detect neuronal activity and respond to synaptic transmission. Because glial cells can release various neuromodulatory substances and that the synthesis of those is often Ca^{2+} -dependent (Martin, 1992), the first functional consequence of our data on synapse glia-interactions is that the synaptic-induced Ca^{2+} elevation in glial cells may result in the production of a number of those substances which would result in a regulation of neuronal properties and synaptic activity. In fact, there is recent evidence of calcium-induced neurotransmitter release by glial cells (Bezzi et al., 1998; Quiroz et al., 1999; Guthrie et al., 1999). Furthermore, the frequency-dependence as well as the rundown of the synaptically-evoked Ca^{2+} responses indicate that the Ca^{2+} -dependent glial neuromodulatory mechanisms will only be recruited during high transmitter release activity and only once, at the beginning of the synaptic activity. An interesting possibility is that the Ca^{2+} elevation in glial cells may result in long lasting effects. Indeed, our data demonstrate the critical role of mGluR activation in the genesis of the responses, hence, likely involving cascades of long lasting events controlled by G-protein activation. In the hippocampus, the optimal conditions required for the production the glial Ca^{2+} responses (i.e.,

high frequency stimulation, for short period of time) will induce important long-lasting synaptic changes like long term potentiation (LTP). Thus, our results raise the possibility that glial cells, based on Ca^{2+} -dependent mechanisms, may be involved in some aspect of this phenomenon of plasticity.

In addition, glial Ca^{2+} -independent mechanisms are also likely to occur. This suggests that glial cells may be involved in a number of other functions and that those may not necessarily be recruited under conditions of high synaptic output.

We have proposed that the presence of functional NMDA receptors on glial cells may be developmentally regulated, expressed in young animals and gradually removed until its absence in adults. It is interesting to note that the activation of NMDA receptors is often required for the induction of LTP and that this process is especially important during development to help consolidating new learning experiences. Consequently, the developmental regulation of glial NMDA receptors could be related to this form of plasticity.

6. REFERENCES

- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1998a. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. 1998b. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822-6829.
- Backus KH, Kettenman H, Schachner M. 1989. Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. *Neurosci Res* 22:274-282.
- Barres BA, Koroshetz WJ, Chun L, Corey D. 1990. Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron* 5:527-544.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Voltera A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Cai Z, Kimelberg HK. 1997. Glutamate-receptor-mediated calcium responses in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Glia* 21:380-389.
- Carmant L, Woodhall G, Ouardouz M, Robitaille R, Lacaille JC. 1997. Interneuron-specific Ca^{2+} responses linked to metabotropic and ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 9:1625-1635.
- Carmignoto G, Pasti L, Pozzan T. 1998. On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 18:4637-4645.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.

D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, McKhann II GM, Janigro D. 1998. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 18:4425-4438.

Dani JW, Chernjavsky A, Smith S. 1992. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.

Duffy S, MacVicar BA. 1994. Potassium-dependent calcium influx in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Neurosci* 61: 51-61.

Duffy S, MacVicar BA. 1995. Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J Neurosci* 15:5535-5550.

Duffy S, MacVicar BA. 1996. In vitro ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 1:71-81.

Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA (1995). GABA_A/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15: 2720-2732.

Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139-143.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MVL, Charles AC, Kater SB. 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.

Harris-White ME, Zanotti SA, Frautschy SA, Charles AC. 1998. Spiral intercellular calcium waves in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 79:1045-1052.

Hassinger TD, Atkinson PB, Strecker GJ, Whalen LR, Dudek FE, Kossel AH, Kater SB. 1995. Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J Neurobiol* 28:159-170.

Hatten ME. 1990. Riding the glial monorail: A common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 13:179-184.

Jabs R, Kirchhoff F, Kettenman H, Steinhauser C. 1994. Kainate activates Ca^{2+} -permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K^+ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflug Arch* 426:310-319.

Jensen AM, Chiu SY. 1991. Differential intracellular calcium responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes. *J Neurosci*. 11:1674-1684.

Jonzon B, Fredholm BB. 1985. Release of purines, noradrenaline, and GABA from rat hippocampal slices by field stimulation. *J Neurochem* 44:217-224.

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.

Keyser DO, Pellmar TC. 1997. Regional differences in glial cell modulation of synaptic transmission. *Hippocampus* 7:73-77.

Kimelberg HK. 1995. Receptors on astrocytes-what possible functions? *Neurochem Int* 26:27-40.

Kimelberg HK, Cai Z, Rastogi P, Charniga CJ, Goderie S, Dave V, Jalonen TO. 1997. Transmitter-induced calcium responses differ in astrocytes acutely isolated from rat brain and in culture. *J Neurochem* 68:1088-1098.

Kuffler SW, Nicholls JG, Martin AR. 1984. *From neuron to brain*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- MacVicar BA. 1984. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.
- MacVicar BA, Tse FWY. 1988. Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured astrocytes. *Glia* 1:359-365.
- MacVicar BA, Hochman D, Dealy MJ, Weiss S. 1991. Modulation of intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by influx through voltage-activated Ca^{2+} channels. *Glia* 4:448-455.
- Martin DL. 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5: 81-94.
- McCarthy KD, Porter JT. 1995. GFAP-positive hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia* 13:101-112.
- McCarthy KD, Salm AK. 1991. Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. *Neuroscience* 41:325-333.
- McKhann II GM, D'Ambrosio R, Janigro D. 1997. Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes. *J Neurosci* 17:6850-6863.
- Nedergaard M. 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
- Newman EA, Zahs KR. 1998. Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18:4022-4028.
- Orkand RK, Nichols JG, Kuffler SW. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the CNS of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.

- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 17:7817-7830.
- Peters A, Palay SL, Webster HD. 1976. The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. W.B. Saunders Co.: New York.
- Pfriefer FW, Barres BA. 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro*. *Science* 277:1684-1687.
- Porter JT, McCarthy KD. 1995. Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes *in situ*. *J Neurochem* 65:1515-1523.
- Porter JT, McCarthy KD. 1996. Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073-5081.
- Porter JT, McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Queiroz G, Meyer DK, Meyer A, Starke K, Von Kügelgen I. 1999. A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience* 91:1171-1181.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kunczi RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Seifert G, Zhou M, Steinhäuser C. 1997. Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol* 78:2916-2923.
- Shao Y, McCarthy KD. 1994. Plasticity of astrocytes. *Glia* 11:147-155.

- Shao Y, McCarthy KD. 1997. Response of Bergmann glia and granule neurons *in situ* to N-methyl-D-aspartate, norepinephrine, and high potassium. *J Neurochem* 68:2405-2411.
- Shelton MK, McCarthy KD. 1999. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors *in situ*. *Glia* 26:1-11.
- Smith S. 1992. Do astrocytes process neural information? *Prog Brain Res* 94:119-136.
- Steinhäuser C, Jabs R, Kettenmann H. 1994. Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 4:19-36.
- Steinhäuser C, Gallo V. 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 19:339-345.
- Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C. 1997. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:1981-1992.
- Ventura R, Harris K. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.
- Verkhratsky A, Kettenmann H. 1996. Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 19:346-352.
- Vernadakis A. 1996. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 49:185-214.
- Walz W, Lang MK. 1998. Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* 257: 127-130.
- Woodhall G, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC. 1999. Membrane potential and intracellular Ca²⁺ oscillations activated by mGluRs in hippocampal stratum oriens/alveus interneurons. *J Neurophysiol* 81:371-382.

Ziak D, Chvatal A, Sykova E. 1998. Glutamate-, kainate- and NMDA-evoked membrane currents in identified glial cells in rat spinal cord slice. *Physiol Res* 47:365-375.

7. FIGURE LEGENDS

Figure 1. Electrophysiological and morphological identification of glial cells. A, Gray scale confocal image showing a selected glial cell during whole-cell recording with a patch pipette containing Oregon green BAPTA-1 in a slice labelled with fluo-3 AM. B, Whole-cell recording from the cell in (A) showing a highly negative resting membrane potential (-72mV ; top traces), a linear I-V profile, and an absence of action potentials following injection of large current pulses (bottom traces). C, Light microscopy image revealing an extensive intercellular coupling of many glial cells labelled with biocytin following the filling of an individual glial cell during whole cell recording in (A) and (B). D, Membrane potential responses during whole-cell recording (top traces) from a visually identified interneuron in stratum radiatum in response to current injection (bottom traces). Typical of neuronal responses, action potentials were elicited by small current injections of $30\text{-}90\text{pA}$. Scale bar represents $25\mu\text{m}$ in (A) and $145\mu\text{m}$ in (C).

Figure 2. Glutamate-evoked Ca^{2+} responses in fluo-3 AM labelled glial cells. A, Gray scale confocal images of two glial cells in stratum radiatum labelled with fluo-3 AM. The top image was taken in control ACSF (Ctl) and the bottom image after local application of glutamate (Glu). Both cells showed increases in fluorescence after glutamate application. B, Change in fluorescence at the cell soma evoked by glutamate for the cell marked with an arrow in (A). Glutamate evoked a transient rise in Ca^{2+} levels. In this and subsequent Figures, the time of application of glutamate is indicated by the triangle.

Figure 3. Stability of Ca^{2+} responses evoked by repeated applications of glutamate and insensitivity to tetrodotoxin (TTX). A, Representative example of Ca^{2+} responses evoked in the same cell by repeated glutamate applications (control ACSF, 15 and 45 min later). Ca^{2+} responses were similar after each application. B, In a different cell, the Ca^{2+} response evoked by glutamate in the presence of 775nM TTX was similar to the response in control ACSF. C, Histograms of the mean peak amplitude (top graph) and area under Ca^{2+} responses (bottom graph) for all cells tested. Responses evoked by repeated glutamate applications were not significantly different (bars at left; n=22 cells), and responses in ACSF were not significantly different from those in TTX (bars at right; n=12 cells).

Figure 4. Different types of Ca^{2+} responses in glial cells. A, Example of cell that responded to glutamate with a transient monophasic increase in Ca^{2+} levels. Transient responses occurred in 92% of cells. B, Example of another type of response consisting of an initial rapid rise in Ca^{2+} levels followed by a plateau elevation. Plateau responses were observed in 8% of cells. C, Example from a cell that showed spontaneous repetitive Ca^{2+} rises that occurred before placement of the glutamate micropipette in the slice. Spontaneous oscillations were seen in 8% of cells.

Figure 5. Partial antagonism of glutamate-evoked responses by the NMDA antagonist APV. A, Example of similar Ca^{2+} responses evoked in a glial cell by repeated local applications of glutamate in the presence of TTX. B, Example from a different cell of unchanged Ca^{2+} responses evoked by glutamate in the presence of 20 μM CNQX. C, Example from another glial cell of the partial reduction of the glutamate-evoked Ca^{2+} response in the presence of 50 μM APV (middle).

The antagonism of APV was reversible and Ca^{2+} responses recovered to control levels after a 30min. washout in TTX (right). D, Histograms of mean peak amplitude (upper graph) and area under Ca^{2+} responses (bottom graph) for all cells tested showing unchanged responses with repeated glutamate applications (left bars) or in the presence of CNQX (middle bars), and the partial antagonism of responses in APV (right bars).

Figure 6. Antagonism of glutamate-evoked Ca^{2+} responses by the L-type Ca^{2+} channel antagonist nimodipine and the group I/II mGluR antagonist MCPG. A, Example of glutamate-evoked Ca^{2+} responses in a glial cell that were reversibly reduced in the presence of nimodipine. B, Example of a complete block of glutamate-evoked Ca^{2+} responses by the group I/II mGluR antagonist MCPG in a different glial cell. The block was partially reversible and glutamate applications evoked Ca^{2+} responses after a 30 min washout in TTX. C, Histograms of mean peak amplitude (upper graph) and area under Ca^{2+} responses (bottom graph) for all cells tested showing the reversible antagonism of responses by nimodipine (left) and MCPG (right).

Figure 7. Ca^{2+} responses elicited in glial cells by Schaffer collateral stimulation. A, Gray scale confocal images of fluo-3 AM labelled glial cells in stratum radiatum, showing increases in fluorescence after brief tetanization (100Hz, 1s) of Schaffer collaterals (Tet) relative to control (Ctl). The arrow points to the glial cell from which the complete Ca^{2+} response is shown in (B). B, Field potential (upper trace) evoked in stratum pyramidale by single pulse stimulation of stratum radiatum in the same slice. Transient increase in intracellular Ca^{2+} levels (bottom trace) elicited by tetanization of Schaffer collaterals for the glial cell indicated in (A). In this and

following Figures, the time of single pulse stimulation is indicated by a filled circle (field potential) and of tetanization by a filled diamond (Ca^{2+} response).

Figure 8. Reversible block of stratum radiatum-evoked field potentials and Ca^{2+} responses by tetrodotoxin. A, In the presence of 775nM TTX, single pulse stimulation of stratum radiatum did not evoke a field potential in stratum pyramidale (left trace). Tetanization of stratum radiatum did not produce either an increase in intracellular Ca^{2+} levels in glial cells (right trace). B, In the same slice, after a 40 min washout in ACSF, single pulse stimulation now evoked a field potential and population spike (left trace). Similarly, tetanization of Schaffer collaterals evoked a typical Ca^{2+} response (right trace) in the glial cell that was previously unresponsive.

Figure 9. Frequency-dependence of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses. A, Single pulse stimulation of Schaffer collaterals evoked field potentials in all slices (left traces). Stimulation of Schaffer collaterals with 1s trains at 5 and 25Hz (top and middle traces) failed to evoke Ca^{2+} responses, but stimulation at 50Hz (bottom trace) evoked large responses (right traces). Examples at each frequency are from different slices. B, Graph of mean peak amplitude (filled triangles, broken line) and area under Ca^{2+} responses (filled circle, solid line) plotted as a function of stimulation frequency, for all cells tested. Ca^{2+} responses were recruited at stimulation frequencies >50Hz and were similar at 50 and 100Hz. Number of responsive cells is indicated in brackets.

Figure 10. Partial antagonism of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses by the non-NMDA antagonist CNQX. A, Example of a field potential and population spike evoked by

single pulse stimulation of Schaffer collaterals (left trace) and the Ca^{2+} response evoked by tetanization in a glial cell of the same slice (right trace) in control ACSF. B, Responses in a different slice in the presence of $20\mu\text{M}$ CNQX. Field potentials evoked by Schaffer collateral stimulation were blocked (left trace) but a Ca^{2+} response was still evoked in glial cells by tetanization of Schaffer collaterals in the same slice (right trace). The Ca^{2+} response in CNQX was smaller relative to that in control ACSF. C, Responses in another slice in the presence of the NMDA antagonist APV ($50\mu\text{M}$). Single pulse stimulation of Schaffer collaterals evoked a field potential and population spike (left trace). Tetanization elicited a Ca^{2+} response similar to those in control ACSF. D, Histograms of the mean peak amplitude (upper graph) and area under Ca^{2+} responses (bottom graph) for all cells tested in control ACSF (open bars), CNQX (gray bars) and APV (filled bars). Ca^{2+} responses were significantly reduced in CNQX relative to control.

Figure 11. Near complete block of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses by the L-type Ca^{2+} channel antagonist nimodipine and the group I/II mGluR antagonist MCPG. A, Responses in a slice exposed to $2\mu\text{M}$ nimodipine. Single pulse stimulation of Schaffer collaterals evoked a field potential and population spike (left trace), as in control ACSF. However, in the same slice, tetanization of Schaffer collaterals failed to evoke a Ca^{2+} response (right trace). B, Responses in another slice exposed to $500\mu\text{M}$ MCPG. Single pulse stimulation of Schaffer collaterals evoked a field potential (left trace). In the same slice, tetanization of Schaffer collaterals did not elicit any Ca^{2+} elevation in glial cells (right trace). C, Histograms of the mean number of glial cells per slice which responded to tetanization of Schaffer collaterals with an increase in intracellular Ca^{2+} levels. The number of responsive cells was significantly smaller in nimodipine (gray bar) and

MCPG (open bar) than in control ACSF (filled bar), but was unchanged in APV (bar with vertical lines) and CNQX (bar with diagonal lines). The number of slices tested in each group is indicated in parentheses.

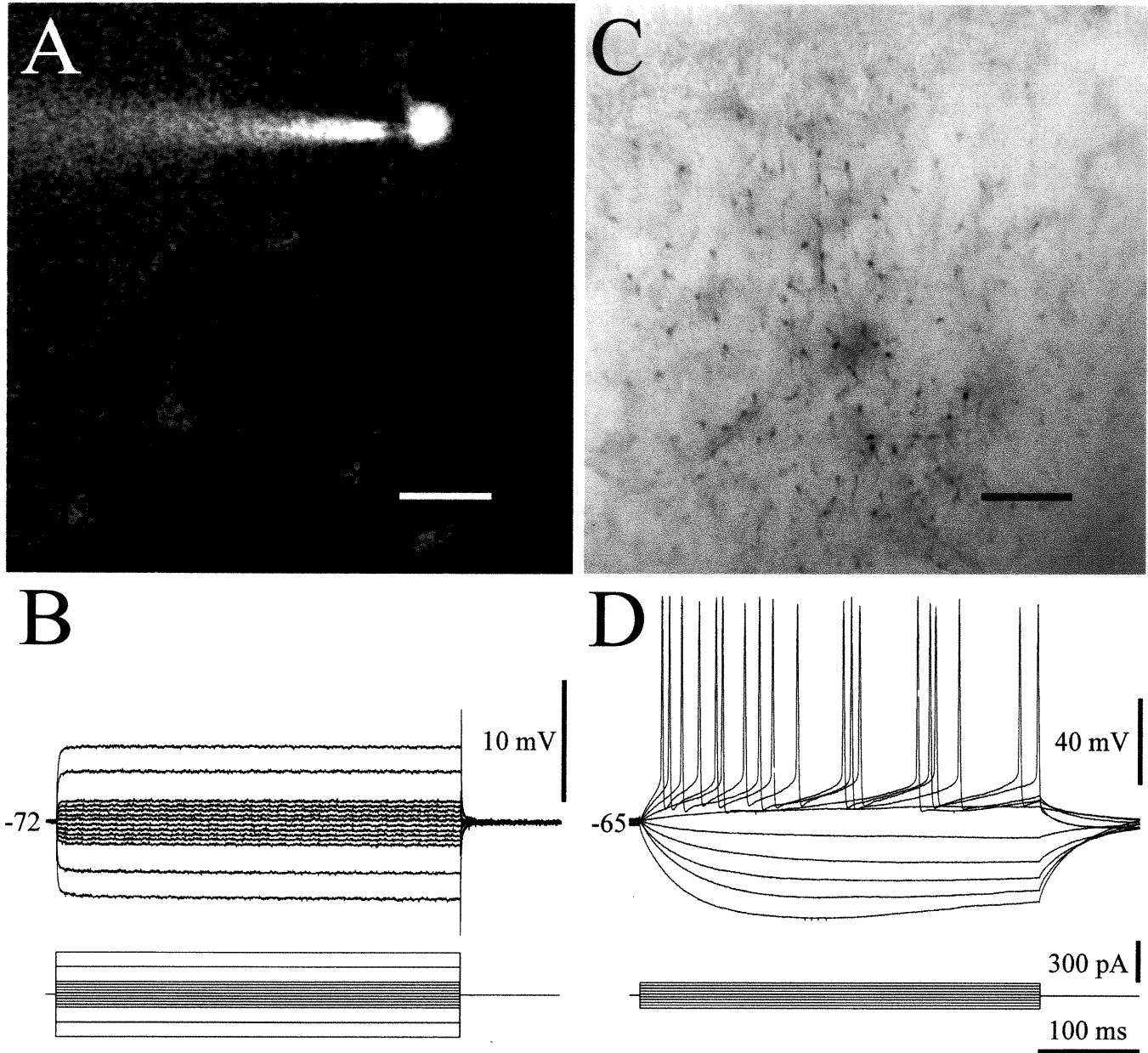


Figure 1: Electrophysiological and morphological identification of glial cells.

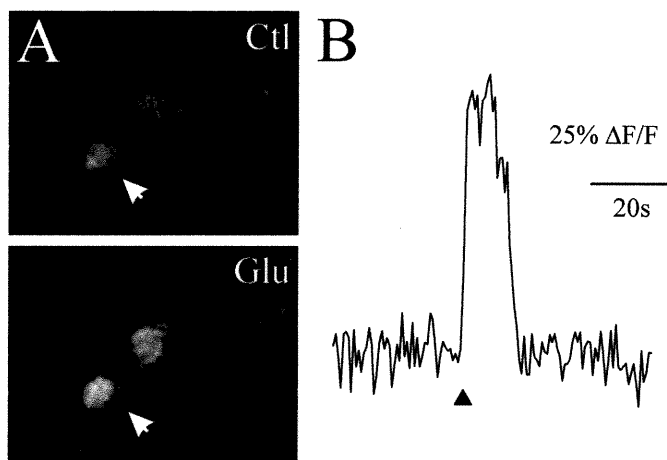


Figure 2: Glutamate-evoked Ca^{2+} responses in fluo-3 AM labelled glial cells.

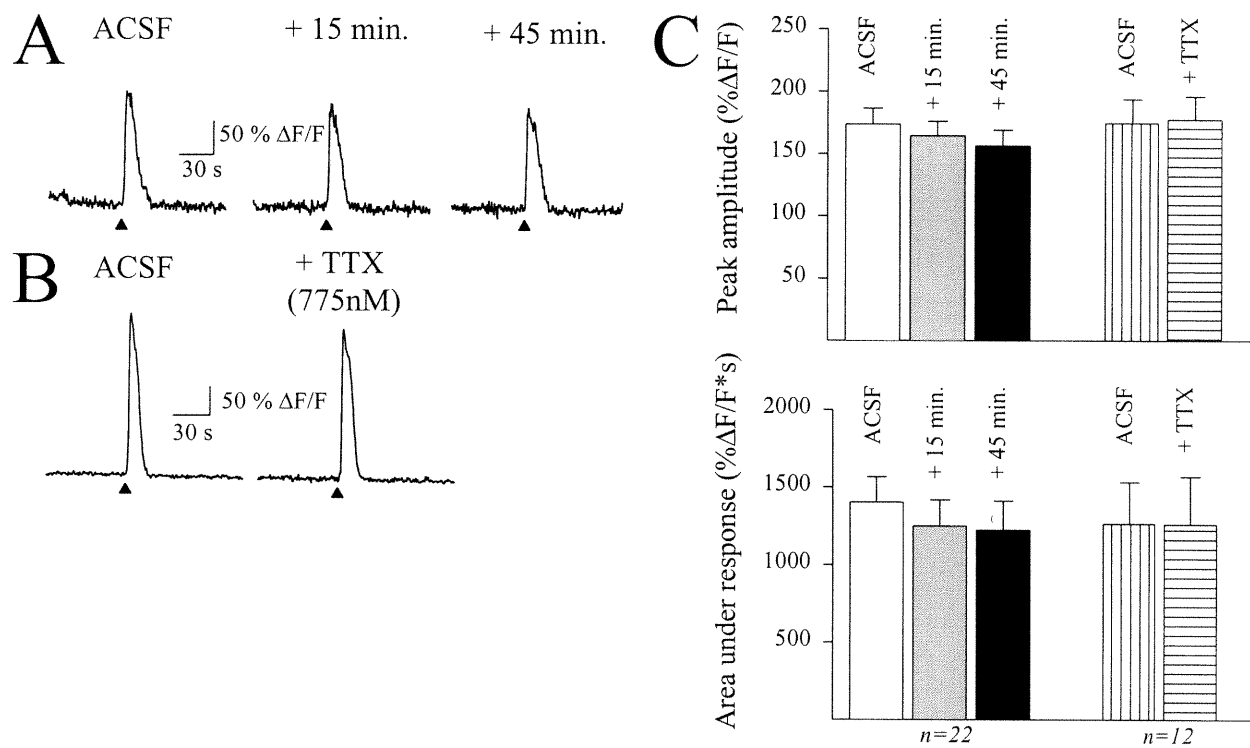


Figure 3: Stability of Ca^{2+} responses evoked by repeated applications of glutamate and insensitivity to tetrodotoxin (TTX).

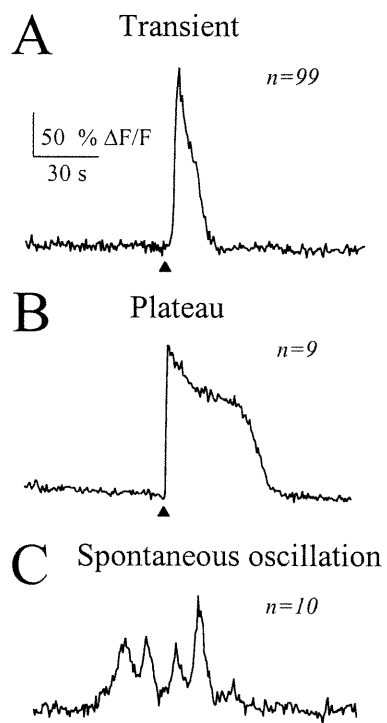


Figure 4: Different types of Ca^{2+} responses in glial cells.

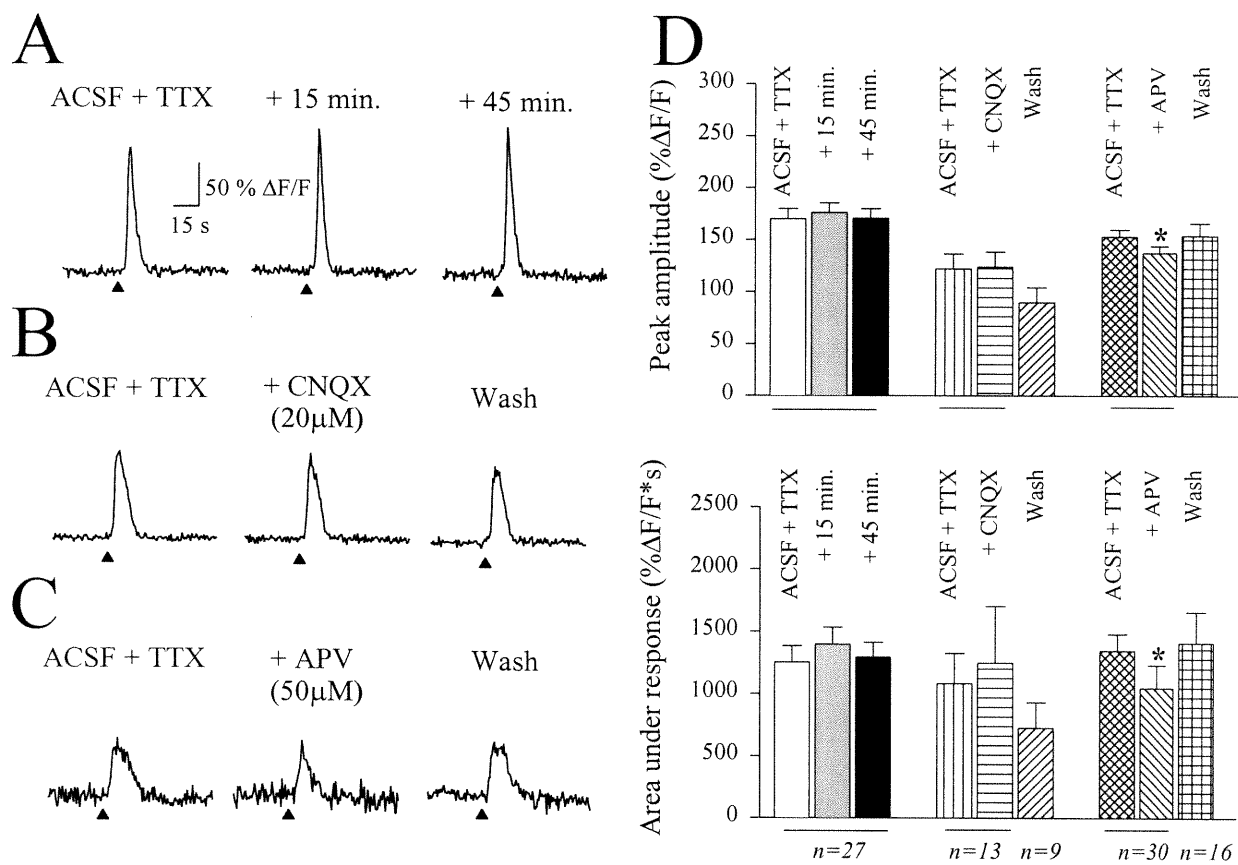


Figure 5: Partial antagonism of glutamate-evoked responses by the NMDA antagonist APV.

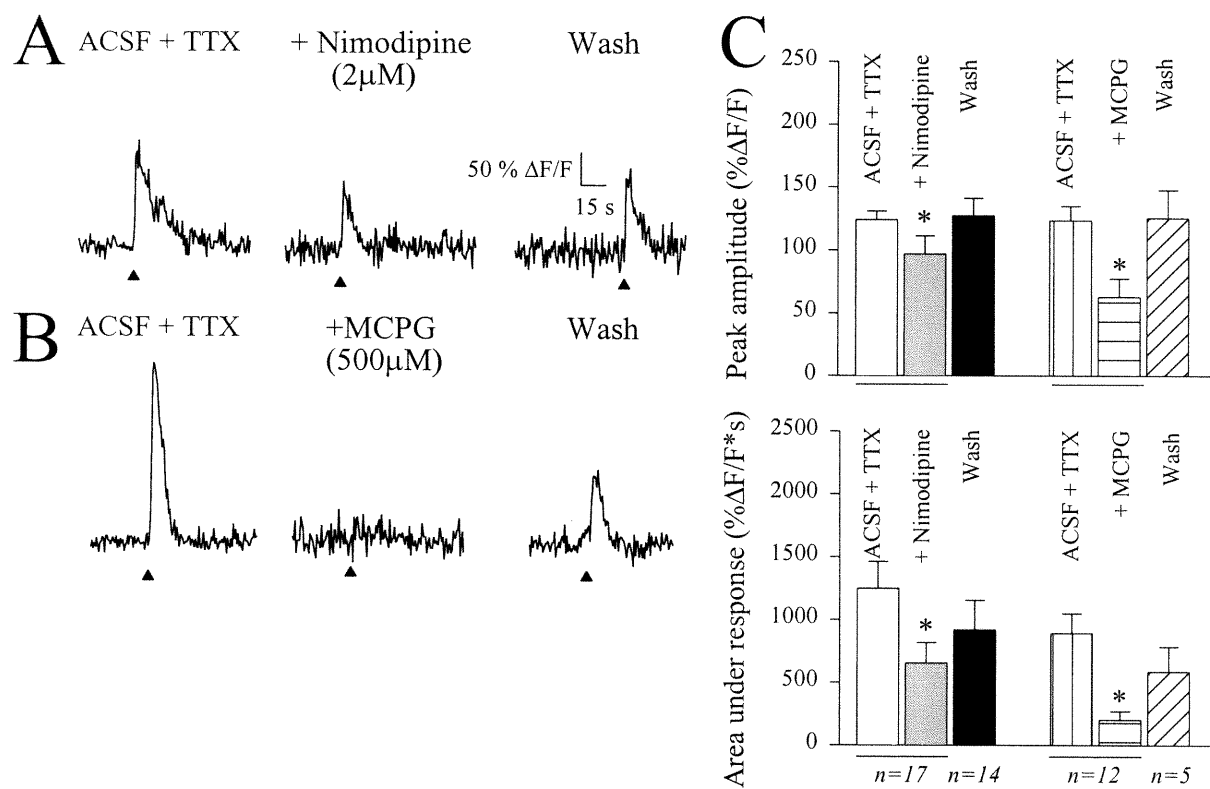


Figure 6: Antagonism of glutamate-evoked Ca^{2+} responses by the L-type Ca^{2+} channel antagonist nimodipine and the group I/II mGluR antagonist MCPG.

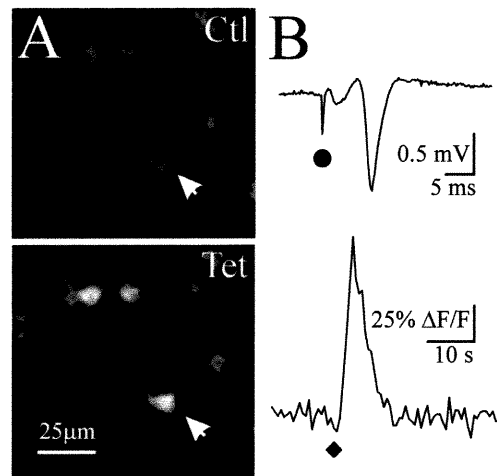


Figure 7: Ca^{2+} responses elicited in glial cells by Schaffer collateral stimulation.

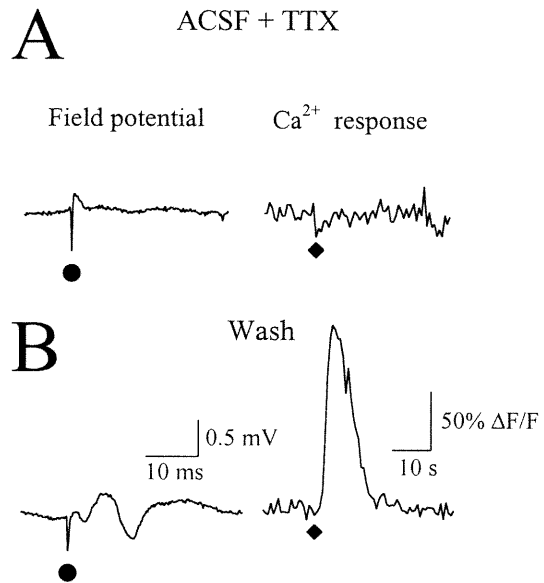


Figure 8: Reversible block of stratum radiatum-evoked field potentials and Ca^{2+} responses by tetrodotoxin.

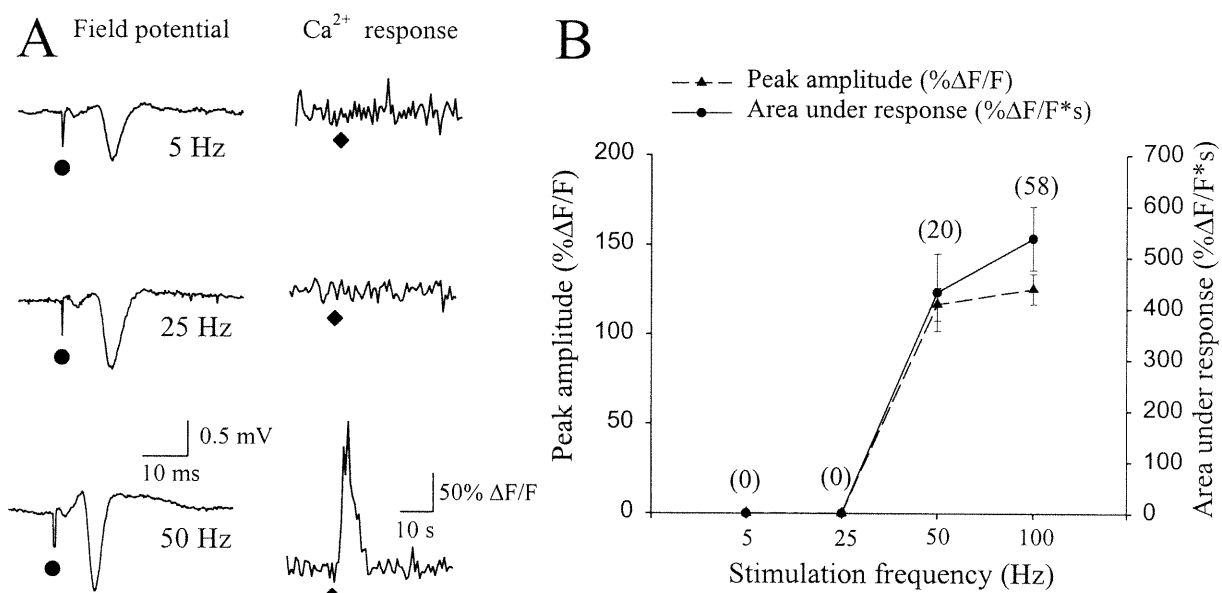


Figure 9: Frequency-dependence of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses.

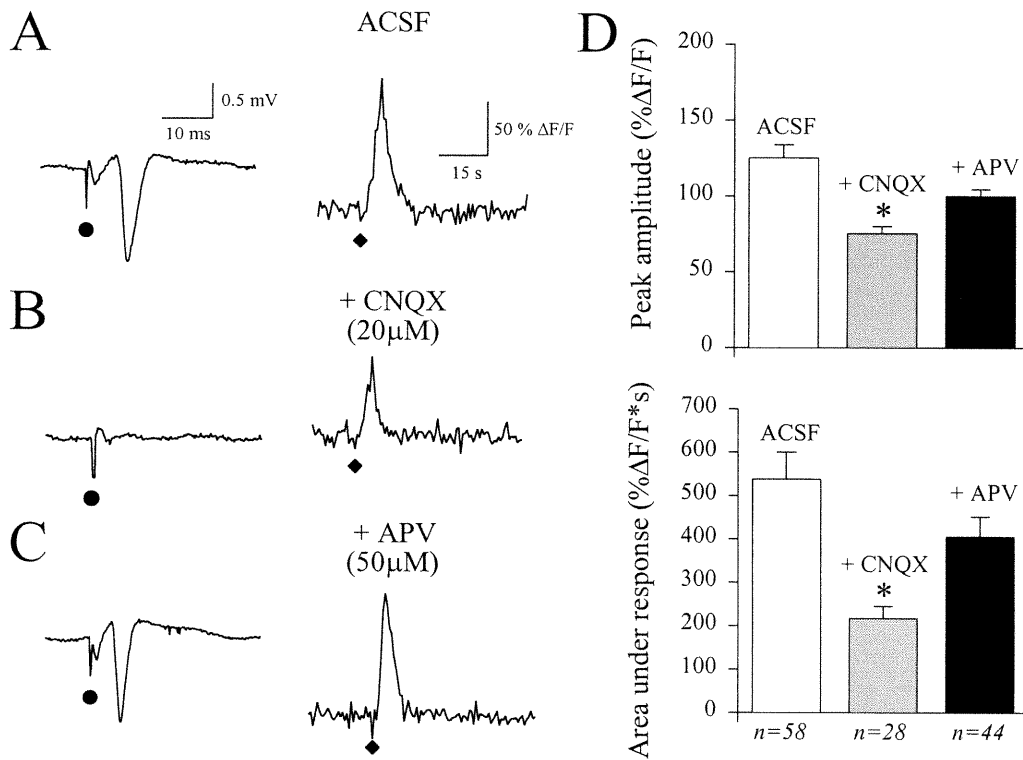


Figure 10: Partial antagonism of Schaffer collateral-evoked Ca^{2+} responses by the non-NMDA antagonist CNQX.

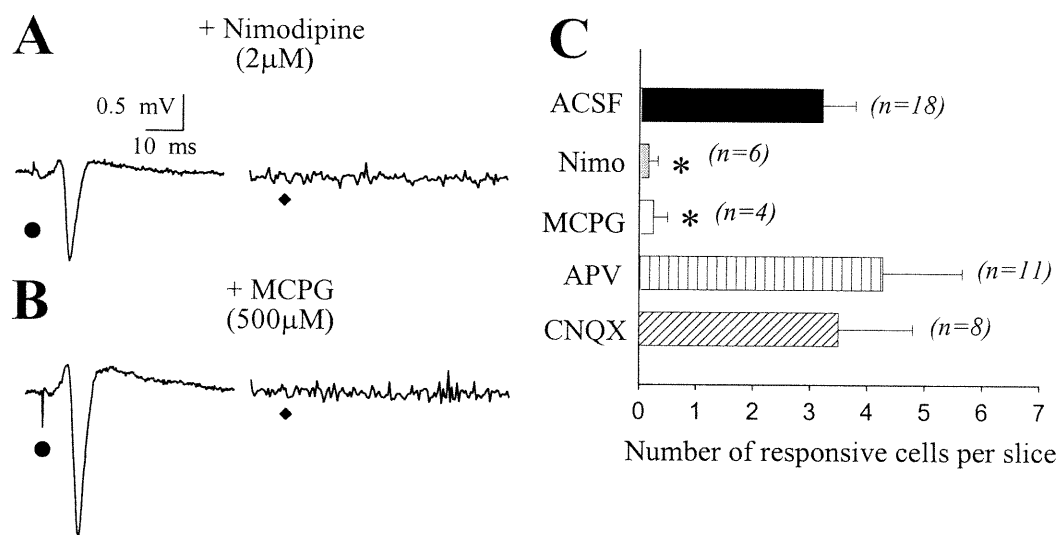


Figure 11: Near complete block of Schaffer collateral-evoked Ca²⁺ responses by the L-type Ca²⁺ channel antagonist nimodipine and the group I/II mGluR antagonist MCPG.

CHAPITRE III. DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans cette étude, nous avons démontré que les cellules gliales répondent *in situ* à l'application locale de glutamate et à l'activité synaptique en activant divers mécanismes calciques, pouvant varier selon la méthode de stimulation employée. Dans cette dernière partie, nos résultats seront interprétés et comparés en faisant référence à la littérature actuelle. Il sera d'abord question du type d'élévation calcique induit chez les astrocytes par le glutamate, puis de l'impact de la fréquence de stimulation des afférences sur le type de réponse calcique observée. Ensuite, nous verrons que nos résultats confirment l'implication des mGluRs dans les réponses induites chez les astrocytes par le glutamate et l'activité synaptique, mais apportent de nouveaux éléments concernant le rôle possible des iGluRs et des canaux calciques de type L. Finalement, nous discuterons des conséquences de la présence des différents types de mécanismes calciques sur le fonctionnement des astrocytes et leur rôle dans la modulation de la transmission synaptique.

1. CARACTÉRISTIQUES DES RÉPONSES CALCIQUES INDUITES CHEZ LES CELLULES GLIALES PAR LE GLUTAMATE ET L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

1.1 Homogénéité des réponses calciques

L'application locale de glutamate et la stimulation des afférences a induit de rapides élévations calciques monophasiques chez les astrocytes. Peu d'études ont démontré que la stimulation des afférences neuronales (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997) ou l'application de glutamate (Porter & McCarthy, 1995; Shelton & McCarthy, 1999) induit des

élevations du Ca^{2+} intracellulaire chez les astrocytes *in situ*. Les formes de réponses calciques rapportées antérieurement, des élévations prolongées et des réponses oscillatoires (Porter & McCarthy, 1995; Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Shelton & McCarthy, 1999), ont été peu fréquentes dans la présente étude. Cette divergence entre le type de réponse calcique observé peut s'expliquer par divers facteurs.

Tout d'abord, il est possible que nous ayons observé un autre type cellulaire que les astrocytes. Ceci est peu probable car nos critères de sélection (taille et forme du corps cellulaire, distribution dans l'hippocampe) ont été confirmés, suivant des enregistrements par patch et l'injection de biocytine, par l'identification des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques propres aux astrocytes de l'hippocampe. Les études observant les réponses calciques induites chez les astrocytes *in situ* par l'application de glutamate ou la stimulation des afférences utilisent le marqueur GFAP pour identifier les astrocytes (Porter & McCarthy, 1995; Porter & McCarthy, 1996; Shelton & McCarthy, 1999). Or, il a été démontré que les astrocytes immunoréactifs à la GFAP de la couche radiatum de la région CA1 de l'hippocampe constituent une sous-population d'astrocytes et qu'un pourcentage considérable des astrocytes de cette région seraient négatifs à la GFAP (Walz & Lang, 1998). En discriminant les astrocytes sur la base de leur immunoréactivité, une large proportion d'astrocytes est exclue, tandis qu'en n'utilisant pas la GFAP comme critère de sélection, l'échantillon étudié représente davantage la population totale des astrocytes du CA1. Une deuxième possibilité est que les réponses calciques observées n'ont pas été induites par le glutamate, mais par la micropipette ou l'éjection de la solution. Il a été démontré que des stimuli mécaniques peuvent induire des réponses calciques chez les astrocytes (Araque et al., 1998). Dans notre cas, ceci est peu probable car l'application locale de liquide cérébro-spinal artificiel n'a induit aucune élévation de calcium chez les astrocytes. Une

autre explication possible concerne le mode d'application du glutamate et sa concentration. Habituellement, le glutamate est perfusé dans le bain durant quelques minutes, tandis que nous l'avons appliqué localement et brièvement. L'application prolongée de glutamate dans le bain favorise l'activation non-sélective directe et indirecte des mécanismes glutamatergiques, en plus de favoriser la désensibilisation des récepteurs et l'excitotoxicité. La concentration de glutamate pourrait également avoir un impact sur le type de réponse calcique observé. Une faible concentration de glutamate semble induire des élévations monophasiques, une concentration modérée, des oscillations et une concentration élevée, des élévations soutenues (Ahmed et al., 1990; Cornell-Bell & Finkbeiner, 1991). L'application locale de glutamate, en restreignant la quantité de glutamate administrée, la durée de son application et la surface affectée, reproduit plus adéquatement la libération naturelle de glutamate par les terminaisons synaptiques. De plus, étant donné que l'application locale de glutamate et la stimulation ont évoqué le même type de réponse chez les astrocytes, l'application locale de glutamate semble reproduire assez fidèlement la libération physiologique du glutamate.

1.2 Effet de la fréquence de stimulation sur les réponses calciques

Afin d'établir les conditions dans lesquelles les cellules gliales répondent à l'activité synaptique et observer l'effet d'une augmentation de la fréquence de stimulation sur la réponse calcique, nous avons systématiquement varié la fréquence de stimulation des afférences. Étant donné qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} chez les astrocytes semble pouvoir induire la libération de neurotransmetteur, (Parpura et al., 1994; Bezzi et al., 1998; Quieroz et al., 1999; Guthrie et al., 1999), ceci permet de déterminer les circonstances où les astrocytes peuvent, à leur tour, moduler l'activité synaptique. Un seul potentiel d'action n'a

induit aucune élévation calcique chez les astrocytes, tel que rapporté (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997). Bien que des oscillations calciques ont été observées chez les cellules gliales suivant la stimulation prolongée des afférences à basse fréquence (Pasti et al., 1997), un seul train de stimuli à une fréquence de stimulation inférieure ou égale à 25Hz n'a induit aucune élévation calcique chez les astrocytes. La stimulation prolongée à basse fréquence permet une plus grande accumulation de neurotransmetteur dans l'espace périssynaptique, tandis qu'un seul train de stimuli à une fréquence basse ou moyenne ne semble pas libérer suffisamment de neurotransmetteur pour induire une réponse calcique chez les astrocytes. Par contre, un seul train de stimuli à une fréquence de 50Hz et plus, donc une stimulation à haute fréquence, semble fournir la concentration de neurotransmetteur requise pour l'induction d'une réponse calcique chez les astrocytes. Cette activité à haute fréquence ne survient dans le SNC normal que dans des circonstances particulières, comme lors de la potentialisation à long terme (PLT), une augmentation prolongée de la transmission synaptique excitatrice induite par la stimulation à haute fréquence des afférences neuronales de l'hippocampe (Bliss & Lomo, 1973).

Bien qu'aucune étude n'avait encore systématiquement varié la fréquence de stimulation des afférences, les résultats antérieurs suggéraient une corrélation entre l'amplitude des réponses calciques et la fréquence de stimulation (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Araque et al., 1999). Or, nos résultats démontrent qu'une fréquence de stimulation de 50 et 100Hz induisent des réponses calciques d'une durée et amplitude statistiquement équivalentes, suggérant une modulation "tout ou rien" de la transmission synaptique par les astrocytes, contrairement à la modulation graduelle suggérée par les observations antérieures (Araque et al., 1999). Cependant, nous ne pouvons exclure la possibilité que d'autres mécanismes gliaux pouvant moduler la transmission synaptique, mais ne requérant pas d'élévation intracellulaire de calcium, comme par

exemple la libération de GABA (Albrecht et al., 1999) et de taurine (Pasantes-Morales et al., 1990), peuvent être activés par des fréquences moins élevées.

1.3 Contribution des canaux calciques de type L

Les canaux calciques de type L semblent avoir contribué de façon importante à l'induction des réponses calciques chez les astrocytes par l'application locale de glutamate ou la stimulation des afférences. La présence de canaux calciques de type L chez les astrocytes *in situ* est supportée par certains (Porter & McCarthy, 1995; Duffy & MacVicar, 1996). Par contre, il a été proposé que l'inhibition des réponses calciques gliales observée suivant l'application d'un antagoniste des canaux calciques de type L reflète l'effet indirect de cet antagoniste sur la libération neuronale de glutamate (Carmignoto et al., 1998). Cette hypothèse n'est cependant pas appuyée par nos résultats, car les réponses calciques induites chez les astrocytes par le glutamate n'ont pas été affectées par la tétrodotoxine (TTX), un puissant bloqueur des canaux sodiques. Ceci indique que l'activation des canaux calciques de type L neuronaux n'est pas nécessaire à l'induction des réponses calciques chez les astrocytes, car le niveau de dépolarisation neuronale élevé nécessaire à l'activation de ce type de canal est bloqué par la TTX. De plus, l'inhibition des réponses calciques par la nimodipine ne peut s'expliquer par une réduction de l'activité synaptique, car l'amplitude des potentiels de champs n'a pas été affectée par la nimodipine. Par conséquent, nos résultats suggèrent que les canaux calciques de type L astrocytaires contribuent aux réponses calciques induites chez les astrocytes par l'application locale de glutamate et l'activité synaptique.

A la synapse, il est reconnu que les canaux calciques voltage-dépendants sont impliqués dans la libération de neurotransmetteurs (Lnenicka & Hong, 1997) (Fig. 12 A). Les différents

types de canaux calciques voltage-dépendants (N, P, Q, T et L) sont distribués de façon hétérogène chez les neurones et contribuent différemment à la modulation de la transmission synaptique selon le type neuronal (McCleskey, 1994). Dans certains cas, le type L peut contribuer à la libération de neurotransmetteurs (Rane et al., 1987; Lemos & Nowycky, 1989; Evans & Pocock, 1999). Bien que les mécanismes menant à la libération de neurotransmetteurs par les cellules gliales ne sont pas encore bien définis, certaines protéines impliquées dans la libération vésiculaire de neurotransmetteurs chez les neurones, telles synaptobrevine, SNAP-23, un analogue de SNAP-25, et syntaxine, ont été identifiées chez les astrocytes (Parpura et al., 1995; Jefinija et al., 1997; Hepp et al., 1999; Araque et al., 2000). Ces résultats indiquent que les astrocytes expriment certaines protéines faisant partie du complexe de fusion des vésicules et suggèrent que les astrocytes libèrent les neurotransmetteurs par exocytose de façon Ca^{2+} -dépendante. Par conséquent, il est possible qu'une fonction des canaux calciques de type L astrocytaires soit de permettre l'entrée de Ca^{2+} nécessaire au déclenchement des mécanismes menant à l'exocytose. Le glutamate libéré par les neurones activerait certains récepteurs glutamatergiques localisés sur les astrocytes (Fig. 12 B) et induiraient une dépolarisation de la membrane astrocytaire (Chen et al., 1997). Ceci activerait les canaux calciques voltage-dépendants (Fig. 12 C), augmenterait la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et favoriserait la libération de glutamate Ca^{2+} -dépendante par les astrocytes (Fig. 12 D). Le glutamate libéré activerait les récepteurs glutamatergiques localisés sur les dendrites des neurones situés à proximité (Fig. 12 E) et produirait une dépolarisation membranaire pouvant atteindre le seuil requis pour l'induction d'un potentiel d'action.

Chez les neurones, l'activation des canaux calciques de type L nécessite une large dépolarisation de la membrane, supérieure à -10mV (Fox et al., 1987). Considérant que le

potentiel de repos membranaire des astrocytes est hyperpolarisé comparé aux neurones, l'activation des canaux calciques de type L astrocytaires demanderait une dépolarisation membranaire encore plus élevée pour atteindre ce seuil. Or, la cinétique d'activation des canaux calciques chez les astrocytes est mal connue. Il est possible qu'elle soit différente de celle des neurones et nécessite une plus faible dépolarisation de la membrane. Par ailleurs, il est également possible que les canaux calciques identifiés chez les astrocytes soient directement modulés par l'activation des mGluRs (Fig. 12 F) et ne nécessitent donc pas une dépolarisation membranaire. Cette modulation des canaux calciques de type L par les mGluRs a été rapportée chez les neurones alors que l'activation des mGluRs de type I augmentaient les courants calciques de type L chez les cellules granulaires du cervelet (Chavis et al., 1996). Etant donné que l'activation des mGluRs et des canaux calciques de type L semblent toutes deux essentielles à l'induction d'une réponse calcique chez les astrocytes, il est possible qu'il existe une interaction entre ces deux mécanismes.

1.4 Implication des récepteurs glutamatergiques

1.4.1 Les récepteurs métabotropiques

Nos résultats indiquent que, tel que suggéré par les études antérieures (Porter & McCarthy, 1995; Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998; Shelton & McCarthy, 1999), les mGluRs sont considérablement impliqués dans les réponses calciques induites chez les astrocytes par l'application locale de glutamate et la stimulation des afférences. Le MCPG affecte certainement les mGluRs présents sur les astrocytes, car il a significativement réduit les réponses calciques induites par le glutamate en présence de TTX et il n'a pas affecté l'amplitude des potentiels de champs. L'effet inhibiteur du MCPG, un antagoniste des mGluRs

du groupe I (Kingston et al., 1995), sur les élévations calciques astrocytaires supporte une découverte récente démontrant que les mGluRs présents chez les astrocytes isolés font partie du groupe I et que, plus précisément, le sous-type mGluR5 serait prédominant chez les astrocytes provenant de rats juvéniles (Cai et al., 2000).

Le sous-type de mGluR du groupe I exprimé, mGluR1 ou mGluR5, pourrait influencer le type de réponse observé suivant l'application prolongée de glutamate. L'activation des mGluR1 induirait principalement des élévations monophasiques tandis que l'activation des mGluR5 induirait plutôt des oscillations (Kawabata et al., 1996, 1998). Ces formes d'élévations calciques pourraient avoir un impact différent sur la modulation des fonctions gliales et par le fait même sur la transmission synaptique. Les réponses oscillatoires semblent davantage associées aux vagues calciques et donc possiblement à une modulation de la transmission synaptique sur une plus grande distance, car les mécanismes de libération de neurotransmetteur Ca^{2+} -dépendants risquent d'être activés chez des astrocytes localisés à un endroit distant. Bien que le sous-type mGluR5 semble dominant chez les astrocytes isolés, nous avons observé peu de réponses oscillatoires suivant l'application locale de glutamate ou l'activité synaptique. Nos résultats suggèrent la présence des mGluR1, mais il est possible qu'une application prolongée de glutamate (Kawabata et al., 1996, 1998), l'application de l'agoniste ACPD (Nakahara et al., 1997), ou l'utilisation d'une concentration plus élevée de glutamate soit requise pour induire une réponse oscillatoire par les mGluR5. Nos résultats supportent la présence des mGluRs du groupe I chez les astrocytes *in situ*, mais ne permettent pas l'identification précise du sous-type (mGluR1 ou mGluR5) car le MCPG n'est pas sélectif. La liaison du glutamate aux mGluRs du groupe I active une protéine G, probablement G_q , dont l'une des trois sous-unités, $\beta\gamma$, pourrait

favoriser l'ouverture des canaux calciques (Balázs et al., 1998) et ainsi augmenter la probabilité de libération Ca^{2+} -dépendante de neurotransmetteur par les astrocytes.

1.4.2 Les récepteurs NMDA

Les élévations calciques induites par l'application locale de glutamate chez les astrocytes semblent en partie dépendantes de l'activation des récepteurs NMDA. Pourtant, l'identification de récepteurs NMDA chez les astrocytes n'est habituellement pas appuyée (Shelton & McCarthy, 1999), car les réponses calciques gliales observées suivant l'application de NMDA sont attribuées à la libération indirecte de glutamate par les récepteurs NMDA neuronaux (Shao & McCarthy, 1997). Toutefois, chez les astrocytes *in situ* de l'hippocampe de rat immature, des réponses calciques induites par le NMDA et résistantes à la TTX ont été observées (Porter & McCarthy, 1995). Chez les astrocytes *in situ* de rats adultes, l'application de NMDA n'a induit aucune élévation calcique (Shelton & McCarthy, 1999), mais les sous-unités formant les récepteurs NMDA, NR1 et NR2, ont été identifiées par immunocytochimie chez des astrocytes du cortex cérébral (Conti et al., 1996). Le niveau d'activation des récepteurs NMDA astrocytaires pourrait être lié au stade développemental de l'organisme. La régulation à la baisse du fonctionnement des récepteurs NMDA est appuyée par les résultats d'une étude rapportant que des courants induits par le NMDA chez les cellules gliales de la colonne vertébrale de rats diminuent lors du développement (Ziak et al., 1998). De plus, cette régulation à la baisse du nombre et du fonctionnement des récepteurs NMDA a aussi été identifiée chez les neurones (Scheetz & Constantine-Paton, 1994). L'activation des récepteurs NMDA pourrait être critique durant le développement en favorisant l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur des astrocytes et la libération

Ca²⁺-dépendante de glutamate. Cette augmentation de la transmission synaptique excitatrice dans l'hippocampe durant le développement pourrait être essentielle à l'apprentissage.

Dans la présente étude, les récepteurs NMDA astrocytaires semblent avoir été activés par l'application locale de glutamate, mais non par la stimulation. Il est intéressant de constater que la stimulation neuronale a induit des réponses calciques significativement plus petites que l'application locale. Cela suggère que la quantité de glutamate appliquée localement est plus élevée que celle libérée de façon physiologique et que l'activité synaptique ne libère pas une quantité suffisante de glutamate pour recruter l'activation des récepteurs NMDA.. Il est possible que les récepteurs NMDA astrocytaires soient localisés à un endroit distant de la synapse (Fig. 12 G) et que seule une concentration élevée de neurotransmetteur puisse les atteindre. Ces récepteurs possèderaient toutefois la capacité de s'activer dans certaines circonstances particulières, où le glutamate est libéré massivement, comme dans certaines conditions pathologiques. Par exemple, l'épilepsie ou l'ischémie semblent impliquer une telle libération massive de glutamate et chez les neurones, les récepteurs NMDA sont reconnus pour être activés dans ces conditions (Vornov & Coyle, 1991; Meldrum, 1994). Cette libération massive de glutamate et l'activation des récepteurs NMDA conduit à la dégénération neuronale par excitotoxicité (Tymianski et al., 1993; Mody & MacDonald, 1995). Par conséquent, un autre rôle des récepteurs NMDA astrocytaires pourrait être de s'activer spécifiquement lors de conditions pathologiques, où le glutamate est libéré massivement, et de mener à l'excitotoxicité des astrocytes en augmentant leur [Ca²⁺]_i et à la neurotoxicité en augmentant la libération Ca²⁺-dépendante de glutamate (Fig. 12 D).

1.4.3 Les récepteurs non-NMDA

Bien que des élévations intracellulaires de Ca^{2+} ont été induites par l'application d'AMPA et de kainate, et que des courants Ca^{2+} non-NMDA ont été enregistrés chez les astrocytes *in situ* (Jabs et al., 1994; Porter & McCarthy, 1995; Steinhäuser & Gallo, 1996; Seifert et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Shelton & McCarthy, 1999), les réponses calciques induites par l'application locale de glutamate n'ont pas été affectées significativement par l'antagoniste CNQX. Cette divergence des résultats pourrait s'expliquer par le fait que les études antérieures ont appliqué les agonistes AMPA et kainate dans le bain, tandis que nous avons appliqué le glutamate localement. Il est possible que des réponses calciques médiées par les récepteurs non-NMDA soient évoquées plus facilement par l'application de ces agonistes que par l'application de glutamate, car les récepteurs AMPA et kainate possèdent une affinité plus élevée pour leurs agonistes respectifs que pour le glutamate.

Les récepteurs non-NMDA semblent avoir contribué aux réponses calciques induites chez les cellules gliales par la stimulation, car les élévations calciques ont significativement été réduites par l'application de CNQX. Ceci peut être causé par un effet direct du CNQX sur les astrocytes ou indirect en affectant l'activité neuronale, car les potentiels de champs ont été abolis par l'antagoniste. L'identification de récepteurs non-NMDA astrocytaires ne laisse aucun doute car leurs sous-unités ont été identifiées (Seifert et al., 1997; Fan et al., 1999) et l'application des agonistes non-NMDA induit des élévations calciques chez les astrocytes *in situ* (Porter & McCarthy, 1996; Shelton & McCarthy, 1999). Par contre, la présence de la sous-unité limitant la perméabilité calcique des récepteurs, la sous-unité GluR2, a été identifiée chez les astrocytes isolés (Seifert et al., 1997). Pourtant, des enregistrements des courants ioniques démontrent une perméabilité intermédiaire des récepteurs non-NMDA astrocytaires aux ions Ca^{2+} (Seifert &

Steinhäuser, 1995). Cette observation indique que la présence de la sous-unité GluR2 ne semble pas toujours associée à une faible perméabilité calcique, car les astrocytes du cortex, exprimant aussi la sous-unité GluR2, répondent à l'application de kainate par une large élévation calcique (Holzwarth et al., 1994). Il a donc été proposé que les récepteurs astrocytaires hétéromériques non-NMDA sont formés de la sous-unité GluR2, limitant la perméabilité calcique, et de sous-unités possédant une perméabilité calcique plus élevée (Seifert & Steinhäuser, 1995). Dépendamment de la combinaison des sous-unités, le récepteur non-NMDA posséderait différents degrés de perméabilité aux ions Ca^{2+} . Etant donné que le CNQX bloque l'activité post-synaptique, mais que les réponses calciques gliales induites par la stimulation demeurent, l'activité post-synaptique ne semble pas essentielle à l'induction de réponses calciques chez les astrocytes. Il est intéressant de constater que le CNQX a réduit la taille des élévations calciques évoquées par l'activité synaptique sans toutefois affecter l'habileté des astrocytes à répondre à la stimulation. Ceci signifie qu'un autre mécanisme calcique activé par le glutamate, certainement les mGluRs, contribue de façon importante aux réponses calciques astrocytaires. Les récepteurs non-NMDA astrocytaires pourraient remplir la même fonction que chez les neurones, c'est-à-dire médier une entrée rapide de Ca^{2+} à l'intérieur de l'astrocyte et induire la dépolarisation membranaire nécessaire à l'activation des canaux calciques de type L (Chen et al., 1997).

1.5 Implications fonctionnelles des élévations calciques gliales

Le glutamate libéré lors de l'activité synaptique peut se répandre hors de l'espace synaptique et activer des récepteurs glutamatergiques situés sur les astrocytes périssynaptiques (Fig.12 B). Les astrocytes peuvent répondre aisément à l'activité synaptique, mais seulement lors d'une période d'activité neuronale élevée ou prolongée. Ceci implique qu'il est peu probable que

les astrocytes participent à la modulation de l'activité synaptique dans des conditions où le niveau d'activité neuronale est faible. De plus, le fait qu'une fréquence de stimulation de 50 et 100Hz produisent des réponses similaires chez les astrocytes suggère que les mêmes mécanismes calciques astrocytaires sont activés par ces concentrations de glutamate et donc que la façon dont les cellules gliales modulent l'activité neuronale ne devrait pas différer. Les réponses calciques induites chez les astrocytes par le glutamate ou l'activité synaptique sont médiées par des récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques (Fig. 12 B) et les canaux calciques de type L. Les canaux calciques voltage-dépendants sont activés par la dépolarisation de la membrane astrocytaire induite par l'activation des iGluRs de type non-NMDA (et NMDA dans certaines conditions) ou directement par les mGluRs (Fig. 12 F). Les différentes implications de l'activation des récepteurs glutamatergiques astrocytaires demeurent largement hypothétiques. Chez les neurones, la voie d'entrée du Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule affecte différentes cascades centrales pour le développement et la plasticité du SNC telles la survie cellulaire dépendante de l'activité, la modulation de la force du contact synaptique et la mort cellulaire Ca^{2+} -dépendante (Ghosh & Greenberg, 1995). Le fait que la glie semble aussi posséder diverses voies d'entrée du Ca^{2+} suggère que chaque mécanisme calcique affecte différemment les processus intracellulaires.

Il existe différentes formes spatio-temporelles d'élévations calciques pouvant être induites par le glutamate ou l'activité synaptique, mais toute augmentation intracellulaire de calcium semble pouvoir induire la libération de neurotransmetteur par les astrocytes (Parpura et al., 1994; Jęftinija et al., 1996; Bezzi et al., 1998). Des évidences en culture suggèrent que les astrocytes libèrent le glutamate par exocytose en activant des mécanismes Ca^{2+} -dépendants (Araque et al., 2000) (Fig. 12 D) et qu'il agit sur les neurones postsynaptiques en activant des iGluRs de type NMDA et non-NMDA (Araque et al., 1998) (Fig. 12 E). Ceci entraîne une

augmentation du Ca^{2+} intracellulaire neuronal (Fig. 12 H) et induit un courant entrant lent (Sanzgiri et al., 1999), pouvant éventuellement atteindre le seuil requis pour évoquer un potentiel d'action et ainsi augmenter la transmission synaptique. L'élévation intracellulaire de Ca^{2+} induite chez un astrocyte par l'activité synaptique peut également se propager chez les astrocytes avoisinants et former des vagues calciques (Fig. 12 I). L'impact de ce type de réponse sur l'activité neuronale implique que les astrocytes peuvent moduler l'activité synaptique des neurones situés à un endroit distant.

L'activation des récepteurs adrénergiques astrocytaires augmente le transport du GABA à l'intérieur des astrocytes. Ceci mène à une diminution de la concentration extracellulaire de GABA et donc possiblement à une hausse de l'activité synaptique des neurones avoisinants (Hansson & Rönnbäck, 1992). Par conséquent, l'activation des récepteurs glutamatergiques astrocytaires pourrait également jouer un tel rôle dans le contrôle de l'excitabilité neuronale, en modulant la composition du milieu extracellulaire. L'activation des récepteurs glutamatergiques astrocytaires pourrait aussi avoir un effet direct sur l'activité neuronale, tel que démontré suivant l'application de prostaglandines. L'application de prostaglandines induit des élévations calciques chez les astrocytes. L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} induit à son tour la libération de glutamate par les astrocytes et ce dernier active les iGluRs neuronaux, évoquant un courant entrant lent de longue durée chez les neurones situés à proximité (Sanzgiri et al., 1999).

2. PERSPECTIVES FUTURES

Notre étude visait à identifier les mécanismes astrocytaires impliqués dans les interactions neurone-glie dans l'hippocampe. Bien que nous ayons apporté de nouveaux éléments intéressants à cette problématique, notamment un rôle développemental possible des récepteurs

NMDA astrocytaires, le débat sur l'identification et le fonctionnement des mécanismes gliaux est loin d'être terminé. Un problème important de l'étude des interactions neurone-glie *in situ* est d'agir sélectivement sur les cellules gliales sans affecter l'activité des neurones.

Les résultats de notre étude suggèrent une contribution importante des mGluRs du groupe I dans la modulation de la transmission synaptique. Ces récepteurs, couplés à une protéine G, produisent de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), un second messager qui active la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires (Abdul-Ghani et al., 1996). Par conséquent, afin de confirmer le rôle de ce type de récepteur dans la modulation de la transmission synaptique, il serait intéressant d'introduire l'IP3 à l'intérieur d'un astrocyte, avec une micropipette de patch, et d'enregistrer l'effet produit sur un neurone situé à proximité. Si les mGluRs du groupe I contribuent effectivement à la modulation de l'activité synaptique, une réponse calcique ou une variation du potentiel membranaire devrait être observée chez le neurone. Il sera intéressant de constater si les astrocytes peuvent effectivement avoir un impact sur l'activité neuronale et démontrer *in situ* que le rôle des astrocytes dans la transmission synaptique est majeur, comme il fut démontré dans le SNP. De plus, le succès de cette expérience suggérerait que l'activation des mGluRs astrocytaires est suffisante pour induire une modification de l'activité synaptique. Aussi, bien que l'on anticipe une augmentation de l'activité neuronale induite par la libération de glutamate par les astrocytes, l'on pourra déterminer plus précisément le type (augmentation ou une réduction de l'activité synaptique) et le degré de modulation exercée par les cellules gliales. Etant donné qu'un couplage par jonctions gap entre les astrocytes et les neurones a été observé dans des co-cultures primaires (Froes et al., 1999) ainsi que dans une de nos tranches marquées à la biocytine, il pourrait être possible que l'IP3 injecté dans un astrocyte se répande chez un

neurone par les jonctions gap et induise une réponse en affectant directement les mGluRs neuronaux. Il serait donc important d'évaluer si l'astrocyte injecté est couplé à des neurones.

Les canaux calciques de type L semblent aussi avoir largement contribué aux réponses calciques évoquées chez les astrocytes par l'application locale de glutamate et la stimulation. Pourtant, chez les neurones, l'activation de ce type de canal calcique requiert une large dépolarisation de la membrane neuronale ($> -10\text{mV}$). Afin de déterminer si l'activation de ce type de canal glial peut moduler la transmission synaptique et d'étudier ses propriétés électrophysiologiques, il serait intéressant d'imposer à un astrocyte différents voltages et d'observer l'effet sur le courant calcique (par des techniques de patch en voltage imposé) et d'observer l'effet produit sur un neurone situé à proximité. Certains astrocytes forment un syncytium et pourraient être plus difficiles à dépolariser. L'ampleur du couplage jonctionnel pourra être déterminé par la présence de biocytine dans les cellules voisines, suivant l'injection de la cellule cible.

Une autre possibilité est que les mGluRs astrocytaires sont responsables de l'activation des canaux calciques voltage-dépendants. Pour explorer cette option, l'on pourrait introduire l'IP3 à l'intérieur d'un astrocyte ou appliquer l'agoniste des mGluRs de type I (le t-ACPD) dans le bain en présence de l'antagoniste des canaux calciques de type L, la nimodipine. Si les élévations calciques observées chez les astrocytes possèdent une amplitude et une aire sous la réponse statistiquement inférieures au groupe contrôle, cela pourrait signifier que 1) la seule activation des mGluRs est insuffisante pour induire une réponse calcique optimale chez les astrocytes; 2) l'activation des canaux calciques voltage-dépendants est nécessaire à la production d'une réponse calcique optimale et 3) il semble que l'activation des mGluRs astrocytaires initie

une cascade d'événements menant effectivement à l'activation des canaux calciques voltage-dépendants.

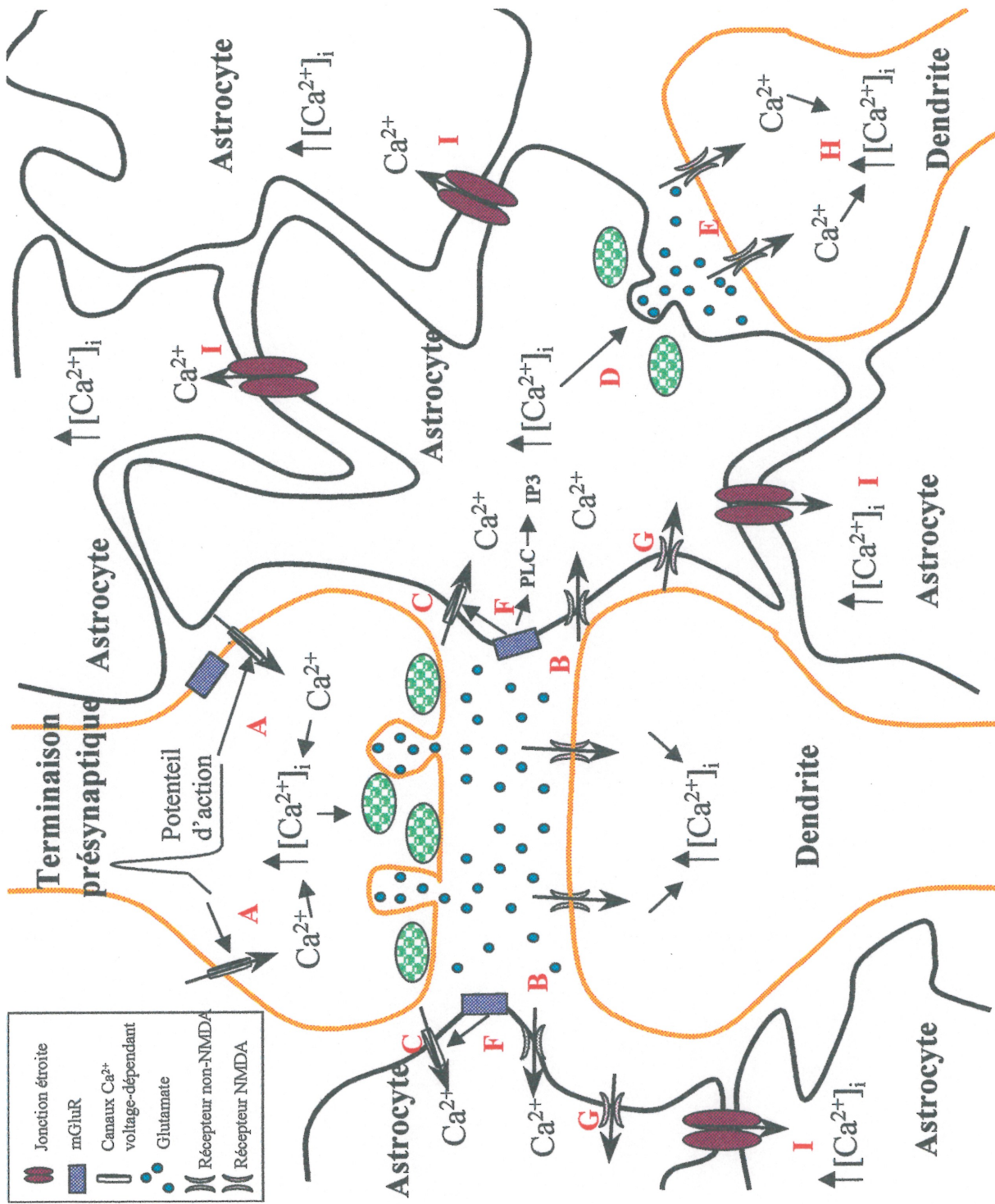


Figure 12: Interactions neurone-glie dans l'hippocampe.

CONCLUSIONS

Les astrocytes *in situ* répondent au glutamate, appliqué localement ou libéré lors de l'activité synaptique, par des élévations calciques médiées par l'activation des récepteurs glutamatergiques (Fig. 12 B). Les canaux calciques de type L astrocytaires semblent également contribuer à ces réponses et pourraient être activés par une dépolarisation de la membrane ou par les mGluRs (Fig. 12 F). La hausse du Ca^{2+} intracellulaire peut produire des vagues calciques astrocytaires (Fig. 12 I) et la libération de neurotransmetteur Ca^{2+} -dépendante (Fig. 12 D). Les neurones situés à proximité répondent à ces neurotransmetteurs en activant divers récepteurs. Dans le cas d'une libération de glutamate, les récepteurs NMDA et non-NMDA neuronaux semblent préférentiellement activés (Fig. 12 E) et induisent une élévation du Ca^{2+} chez les neurones (Fig 12 H), pouvant mener à la production d'un potentiel d'action. Ces résultats démontrent que les astrocytes répondent à l'activité neuronale et peuvent être impliqués dans la modulation de l'activité synaptique.

SOURCES DOCUMENTAIRES

Abdul-Ghani, MA, Valiante, TA, Carlen, PL, Pennefather, PS. 1996. Metabotropic glutamate receptors couples to IP3 production mediate inhibition of IAHP in rat dentate granule neurons. *J Neurophysiol* 76:2691-2700.

Ahmed, Z, Lewis, CA, Faber, DS. 1990. Glutamate stimulates release of Ca²⁺ from internal stores in astroglia. *Brain Res* 516:165-169.

Akiyama, H, Itagaki, S, McGeer, PL. 1988. Major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia following epidural kainic acid lesions. *J Neurosci Res* 20:147-157.

Alaluf, S, Mulvihill, ER, Willmott, N, McIlhinney, RA. 1995. Agonist mediated phosphorylation of metabotropic glutamate receptor 1 alpha by protein kinase C in permanently transfected BHK cells. *Biochem Soc Trans* 23:88S.

Albrecht, J, Bender, AS, Norenberg, MD. 1998. Potassium-stimulated GABA release is a chloride-dependent but sodium- and calcium-independent process in cultured astrocytes. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 58:169-175.

Amenta, F, Bronzetti, E, Sabbatini, M, Vega JA. 1998. Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. *Microsc Res Tech* 43:29-33.

Andersen, P, Bliss, TV, Lomo, T, Olsen, LI, Skrede, KK. 1969. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand* 76:4A-5A.

Araque, A, Parpura, V, Sanzgiri, RP, Haydon, PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *TINS* 22:208-215.

Araque, A, Parpura, V, Sanzgiri, RP, Haydon, PG. 1998a. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.

Araque, A, Sanzgiri, RP, Parpura, V, Haydon, PG. 1998b. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822-6829.

Araque, A, Li, N, Doyle, RT, Haydon, PG. 2000. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666-673.

Backus, KH, Kettenman, H, Schachner, M. 1989. Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. *Neurosci Res* 22:274-282.

Bal, A, Bachelot, T, Savasta, M, Manier, M, Verna, JM, Benabid, AL, Feuerstein, C. 1994. Evidence for dopamine D2 receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: *in situ* hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Res Mol Brain Res* 23:204-212.

Balazs, R, Miller, S, Chun, Y, O'Toole, J, Cotman, CW. 1998. Metabotropic glutamate receptor agonists potentiate cyclic AMP formation induced by forskolin or beta-adrenergic receptor activation in cerebral cortical astrocytes in culture. *J Neurochem* 70:2446-2458.

Ballanyi, K, Muckenhoff, K, Bellingham, MC, Okada, Y, Scheid, P, Richter, DW. 1994. Activity-related pH changes in respiratory neurons and glial cells of cats. *NeuroReport* 6:33-36.

Balster, RL, Willetts, J. 1988. Receptor mediation of the discriminative stimulus properties of phencyclidine and sigma-opioid agonists. *Psychopharmacol Ser* 4:122-135.

Barres, BA, Koroshetz, WJ, Chun, L, Corey, D. 1990. Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron* 5:527-544.

Beattie, DT, Cunnane, TC, Muir, TC. 1986. Effects of calcium channel antagonists on action potential conduction and transmitter release in the guinea-pig vas deferens. *Br J Pharmacol* 89:235-244.

Bender, AS, Schousboe, A, Reichelt, W, Norenberg, MD. 1998. Ionic mechanisms in glutamate-induced astrocyte swelling: role of K^+ influx. *J Neurosci Res* 52:307-321.

Bergles, DE, Jahr, CE. 1998. Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7709-7716.

Berwald-Netter, Y, Martin-Moutot, N, Koulakoff, A, Couraud, F. 1981. Na^+ -channel-associated scorpion toxin receptor sites as probes for neuronal evolution in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:1245-1249.

Bezzi, P, Carmignoto, G, Pasti, L, Vesce, S, Rossi, D, Rizzini, BL, Pozzan, T, Voltera, A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.

Bjartmar, C, Hildebrand, C, Loinder, K. 1994. Morphological heterogeneity of rat oligodendrocytes: electron microscopic studies on serial sections. *Glia* 11:235-244.

Black, JA, Sontheimer, H, Waxman, SG. 1993. Spinal cord astrocytes in vitro: phenotypic diversity and sodium channel immunoreactivity. *Glia* 7:272-285.

Black, JA, Yokoyama, S, Waxman, SG, Oh, Y, Zur, KB, Sontheimer, H, Higashida, H, Ransom, BR. 1994. Sodium channel mRNAs in cultured spinal cord astrocytes: *in situ* hybridization in identified cell types. *Brain Res Mol Brain Res* 23:235-245.

Black, JA, Westenbroek, R, Minturn, JE, Ransom, BR, Catterall, WA, Waxman, SG. 1995. Isoform-specific expression of sodium channels in astrocytes in vitro: immunocytochemical observations. *Glia* 14:133-144.

Bliss, TV, Collingridge, GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Boitano, S, Dirksen, ER, Sanderson, MJ. 1992. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 258:292-295.

Bollmann, JH, Helmchen, F, Borst, JG, Sakmann, B. 1998. Postsynaptic Ca^{2+} influx mediated by three different pathways during synaptic transmission at a calyx-type synapse. *J Neurosci* 1998 18:10409-10419.

Bordey, A, Sontheimer, H. 1997. Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes *in situ*. *J Neurophysiol* 78:461-477.

Bosio, A, Bussow, H, Adam, J, Stoffel, W. 1998. Galactosphingolipids and axono-glia interaction in myelin of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 292:199-210.

Bourque, MJ, Robitaille, R. 1998. Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 512:197-209.

Boya, J, Carbonell, AL, Calvo, JL, Borregon, A. 1991. Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: Cytochemical identification using two different lectins. *Acta Anat* 140:250-253.

Boya, J, Carbonell, AL, Calvo, JL, Borregon, A. 1987. Ultrastructural study on the origin of rat microglial cells. *Acta Anat* 130:329-335.

Brew, H, Gray, PT, Mobbs, P, Attwell, D. 1986. Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate K^+ buffering. *Nature* 324:466-468.

Brookes, N, Turner, RJ. 1994. K^+ -induced alkalization in mouse cerebral astrocytes mediated by reversal of electrogenic Na^+ - HCO_3^- cotransport. *Am J Physiol* 267:C1633-C1640.

Bruce-Keller, AJ. 1999. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 58:191-201.

Brust-Mascher, I, Webb, WW. 1998. Calcium waves induced by large voltage pulses in fish keratocytes. *Biophys J* 75:1669-1678.

Buhl, EH, Han, ZS, Lorinczi, Z, Stezhka, VV, Karnup, SV, Somogyi, P. 1994. Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 71:1298-1307.

Cai, Z, Kimelberg, HK. 1997. Glutamate-receptor-mediated calcium responses in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Glia* 21:380-389.

Cai, Z, Schools, GP, Kimelberg, HK. 2000. Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. *Glia* 2000 29:70-80.

Carlo, P, Del Rio, M, Violani, E, Sciaba, L, Picotti, GB. 1996. Influence of culture conditions on monoamine oxidase A and B activity in rat astrocytes. *Cell Biochem Funct* 14:19-25.

Carman-Krzan, M, Vige, X, Wise, BC. 1991. Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. *J Neurochem* 56:636-643.

Carmant, L, Woodhall, G, Ouardouz, M, Robitaille, R, Lacaille, J-C. 1997. Interneuron-specific Ca^{2+} responses linked to metabotropic and ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Eur J of Neurosci* 9:1625-1635.

Carmignoto, G, Pasti, L and Pozzan, T. 1998. On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 18:4637-4645.

Cebers, G, Ceber, A, Wagner, A, Liljequist, S. 1999. Prolonged inhibition of glutamate reuptake down-regulates NMDA receptor functions in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 72:2181-2190.

Chavis, P, Fagni, L, Lansman, JB, Bockaert, J. 1996. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature* 382:719-722.

Chen, JC, Chesler, M. 1992. pH transients evoked by excitatory synaptic transmission are increased by inhibition of extracellular carbonic anhydrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7786-7790.

Chen, J, Backus, KH, Deitmer, JW. 1997. Intracellular calcium transients and potassium current oscillations evoked by glutamate in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:7278-7287.

Chesler, M. 1990. The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog Neurobiol* 34:401-427.

Chesler, M, Kraig, RP. 1987. Intracellular pH of astrocytes increases rapidly with cortical stimulation. *Am J Physiol* 253:R666-R670.

Chesler, M, Rice, ME. 1991. Extracellular alkaline-acid pH shifts evoked by iontophoresis of glutamate and aspartate in turtle cerebellum. *Neuroscience* 41:257-267.

Chittajallu, R, Braithwaite, SP, Clarke, VR, Henley, JM. 1999. Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* 20:26-35.

Cochilla, AJ, Alford, S. 1998. Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron* 20:1007-1016.

Collingridge, GL, Kehl, SJ, McLennan, H. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 334:33-46.

Conn, PJ, Pin, JP. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.

Conti, F, DeBiasi, S, Minelli, A, Melone, M. 1996. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17:254-258.

Cornell-Bell, AH, Finkbeiner, SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.

Cornell-Bell, AH, Finkbeiner, SM. 1991. Ca^{2+} waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12:185-204.

Craig, CG, White, TD. 1993. N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem* 60:1073-1080.

Cull-Candy, SG, Usowicz, MM. 1987. Multiple-conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. *Nature* 325:525-528.

Dalmau, I, Finsen, B, Zimmer, J, Gonzalez, B, Castellano, B. 1998. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8:458-474.

D'Ambrosio, R, Wenzel, J, Schwartzkroin, PA, McKhann II, GM, Janigro, D. 1998. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 18:4425-4438.

Danbolt, NC, Storm-Mathisen, J, Ottersen, OP. 1994. Sodium/potassium-coupled glutamate transporters, a "new" family of eukaryotic proteins: do they have "new" physiological roles and could they be new targets for pharmacological intervention? *Prog Brain Res* 100:53-60.

Dani JW, Chernjavsky, A, Smith, S. 1992. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocytes networks. *Neuron* 8:429-440.

Davis, EJ, Foster, TD, Thomas, WE. 1994. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34:73-78.

DeFeudis, FV. 1982. GABA--an inhibitory neurotransmitter that is involved in cardiovascular control. *Pharmacol Res Commun* 14:567-575.

Deitmer, JW, Szatkowski, M. 1990. Membrane potential dependence of intracellular pH regulation by identified glial cells in the leech central nervous system. *J Physiol (Lond)* 421:617-631.

Demer, LL, Wortham, CM, Dirksen, ER, Sanderson, MJ. 1993. Mechanical stimulation induces intercellular calcium signaling in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 264:H2094-H2102.

Dietzel, I, Heinemann, U, Hofmeier, G, Lux, HD. 1982. Stimulus-induced changes in extracellular Na^+ and Cl^- concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. *Exp Brain Res* 46:73-84.

Dingledine, R, Hume, RI, Heinemann, SF. 1992. Structural determinants of barium permeation and rectification in non-NMDA glutamate receptor channels. *J Neurosci* 12:4080-4087.

Dreyer, F, Peper, K, Akert, K, Sandri, C, Moor, H. 1973. Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction. *Brain Res* 62:373-380.

Duffy, S, MacVicar, BA. 1994. Potassium-dependent calcium influx in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Neurosci* 61:51-61.

Duffy, S, MacVicar, BA. 1995. Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J Neurosci* 15:5535-5550.

Duffy, S, MacVicar, BA. 1996. In vitro ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 1:71-81.

Eliasson, C, Sahlgren, C, Berthold, CH, Stakeberg, J, Celis, JE, Betsholtz, C, Eriksson, JE, Pekny, M. 1999. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274:23996-24006.

Elkabes, S, DiCicco-Bloom, EM, Black, IB. 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16:2508-2521.

Eng, LF. 1985. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8:203-214.

Eng, LF, Ghirnikar, RS. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229-237.

Evans, GJ, Pocock, JM. 1999. Modulation of neurotransmitter release by dihydropyridine-sensitive calcium channels involves tyrosine phosphorylation. *Eur J Neurosci* 11:279-292.

Fan, D, Grooms, SY, Araneda, RC, Johnson, AB, Dobrenis, K, Kessler, JA, Zukin, RS. 1999. AMPA receptor protein expression and function in astrocytes cultured from hippocampus. *J Neurosci Res* 57:557-571.

Fawcett, JW, Asher, RA. 1999. The glial scar and the nervous system repair. *Brain Res Bull* 49:377-391.

Ferrer, I, Bernet, E, Soriano, E, del Rio, T, Fonseca, M. 1990. Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39:451-458.

Finkbeiner, SM. 1993. Glial calcium. *Glia* 9:83-104.

Fitch, MT, Doller, C, Combs, CK, Landreth, GE, Silver, J. 1999. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: In vivo and In vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* 19:8182-8198.

Fong, TM, Davidson, N, Lester, HA. 1989. Further evidence demonstrating that N-methyl-D-aspartate and kainate activate distinct ion channels. *Synapse* 4:88-95.

Forsyth, RJ. 1996. Astrocytes and the delivery of glucose from plasma to neurons. *Neurochem Int* 28:231-241.

Forsythe, ID, Westbrook, GL, Mayer, ML. 1988. Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons. *J Neurosci* 8:3733-3741.

Fox, AP, Nowycky, MC, Tsien, RW. 1987. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol (Lond)* 394:149-172.

Froes, MM, Correia, AH, Garcia-Abreu J, Spray, DC, Campos de Carvalho, AC, Neto, MV. 1999. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7541-7546.

Fujita, T, Ito, Y. 1993. Salt loads attenuate potassium-induced vasodilation of forearm vasculature in humans. *Hypertension* 21:772-778.

Gasser, UE, Hatten, ME. 1990. Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4543-4547.

Gegelashvili, G, Schousboe, A. 1998. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull* 45:233-238.

Ghosh, A, Greenberg, ME. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247.

Giulian, D. 1988. The immune response and astrogliosis: Control of astroglial growth by secretion of microglial peptides. *Neurol Neurobiol* 39:91-106.

Giulian, D, Young, Dg, Woodward, J, Brown, DC, Lachman, LB. 1988. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci* 8:709-714.

Giulian, D, Li, J, Bartel, S, Broker, J, Li, X, Kirkpatrick, JB. 1995. Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J Neurosci* 15:7712-7726.

Glenn, JA, Ward, SA, Stone, CR, Booth, PL. 1992. Characterization of ramified microglial cells-detailed morphological plasticity and proliferative capability. *J Anat* 180:109-118.

Grosche, J, Matyash, V, Möller, T, Verkhratsky, A, Reichenbach, A, Kettenman, H. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neuroscience* 2:139-143.

Guthrie, PB, Knappenberger, J, Segal, M, Bennett, MVL, Charles, AC, Kater, SB. 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.

Haddy, FJ, Pamnani, MB. 1987. Pharmacologic agents for the in vivo detection of vascular sodium transport defects in hypertension. *Life Sci* 41:2685-2696.

Hailer, NP, Grampp, A, Nitsch, R. 1999. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following enthorinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* 11:3359-3364.

Hajos, F, Zilles, K. 1995. Areas of dormant glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the rat brain as revealed by automated image analysis of serial coronal sections. *Neurobiology* 3:3-11.

Hampson, EC, Robinson, SR. 1995. Heterogeneous morphology and tracer coupling patterns of retinal oligodendrocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:353-364.

Hansson, E, Rönnbäck, L. 1992. Adrenergic receptor regulation of amino acid neurotransmitter uptake in astrocytes. *Brain Res Bull* 29:297-301.

Harder, DR, Alkayed, NJ, Lange, AR, Gebremedhin, D, Roman, RJ. 1998. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 29:229-234.

Harris-White, ME, Zanotti, SA, Frautschy, SA, Charles, AC. 1998. Spiral intercellular calcium waves in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 79:1045-1052.

Hassinger, TD, Atkinson, PB, Strecker, GJ, Whalen, LR, Dudek, FE, Kossel, AH, Kater, SB. 1995. Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J Neurobiol* 28:159-170.

Hatten, ME. 1990. Riding the glial monorail: A common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 13:179-184.

Hatten, ME. 1999. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539.

Hayashi, Y, Nomura, M, Yamagishi, S, Harada, S, Yamashita, J, Yamamoto, H. 1997. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19:13-26.

Hepp, R, Perraut, M, Chasserot-Golaz, S, Galli, T, Aunis, D, Langley, K, Grant, NJ. 1999. Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia* 27:181-187.

Hertz, L, Wu PH, Schousboe, A. 1978. Evidence for net uptake of GABA into mouse astrocytes in primary cultures-its sodium dependence and potassium independence. *Neurochem Res* 3:313-323.

Hickey, WF, Kimura, H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.

Hildebrand, C, Remahl, S, Persson, H, Bjartmar, C. 1993. Myelinated nerve fibers in the CNS. *Prog Neurobiol* 40:319-384.

Hirst, WD, Cheung, NY, Rattray, M, Price, GW, Wilkin, GP. 1998. Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT₁ receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 61:90-99.

Hoehn, K, White, TD. 1990. N-methyl-D-aspartate, kainate and quisqualate release endogenous adenosine from rat cortical slices. *Neuroscience* 39:441-450.

Hollmann, M, Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.

Holzwarth, JA, Gibbons, SJ, Brorson, JR, Philipson, LH, Miller, RJ. 1994. Glutamate receptor agonists stimulate diverse calcium responses in different types of cultured rat cortical glial cells. *J Neurosci* 14:1879-1891.

Honore, T, Davies, SN, Drejer, J, Fletcher, EJ, Jacobsen, P, Lodge, D, Nielsen, FE. 1988. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 241:701-703.

Imai, F, Sawada, M, Suzuki, H, Zlokovic, BV, Kojima, J, Kuno, S, Nagatsu, T, Nitatori, T, Uchiyama, Y, Kanno, T. 1999. Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci Lett* 10:127-130.

Inazu, M, Takeda, H, Ikoshi, H, Uchida, Y, Kubota, N, Kiuchi, Y, Oguchi, K, Matsumiya T. 1999. Regulation of dopamine uptake by basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 34:235-244.

Innocenti, GM, Koppel, H, Clarke, S. 1983. Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. I. Light and electron microscopic characteristics and distribution. *Dev Brain Res* 11:39-53.

Ishizuka, N, Cowan, WM, Amaral, DG. 1995. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 362:17-45.

Ivy, OG, Killackey, HP. 1978. Transient populations of glial cells in developing rat telencephalon revealed by horseradish peroxidase. *Brain Res* 158:213-218.

Jabs, R, Kirchhoff, F, Kettenman, H, Steinhauser, C. 1994. Kainate activates Ca^{2+} -permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K^+ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflug Arch Eur J Physiol* 426:310-319.

Jaeger, CB. 1988. Plasticity of astroglia: evidence supporting process elongation by "stretch". *Glia* 1:31-38.

Jahromi, BS, Robitaille, R, Charlton, MP. 1992. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells *in situ*. *Neuron* 8:1069-1077.

Jeftinija, SD, Jeftinija, KV, Stefanovic, G, Liu, F. 1996. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from cultured astrocytes. *J Neurochem* 66:676-684.

Jeftinija, SD, Jeftinija, KV, Stefanovic, G. 1997. Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release. *Brain Res* 750:41-47.

Jendelova, P, Sykova, E. 1991. Role of glia in K⁺ and pH homeostasis in the neonatal rat spinal cord. *Glia* 4:56-63.

Jensen, AM, Chiu, SY. 1990. Fluorescence measurement of changes in intracellular calcium by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes. *J Neurosci* 10:1165-1175.

Jensen, AM, Chiu, SY. 1991. Differential intracellular calcium responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes. *J Neurosci*. 11:1674-1684.

Johnstone, M, Gearing, AJ, Miller, KM. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 1:182-193.

Jonzon, B and Fredholm, BB. 1985. Release of purines, noradrenaline, and GABA from rat hippocampal slices by field stimulation. *J Neurochem* 44:217-224.

Kaila, K, Voipio, J. 1987. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature* 330:163-165.

Kaila, K, Saarikoski, J, Voipio, J. 1990. Mechanism of action of GABA on intracellular pH and on surface pH in crayfish muscle fibres. *J Physiol (Lond)* 427:241-260.

Kang J, Jiang L, Goldman, SA, Nedergaard, M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neurosci* 1:683-692.

Kawabata, S, Tsutsumi, R, Kohara, A, Yamaguchi, T, Nakanishi, S, Okada, M. 1996. Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* 383:89-92.

Kawabata, S, Kohara, A, Tsutsumi, R, Itahana, H, Hayashibe, S, Yamaguchi, T, Okada, M. 1998. Diversity of calcium signaling by metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 273:17381-17385.

Kelly, DE. 1967. Fine structure of cell contact and the synapse. *Anesthesiology* 28:6-30.

Kettenmann, H. 1999. Physiology of glial cells. *Adv Neurol* 79:565-571.

Keyser, DO, Pellmar, TC. 1997. Regional differences in glial cell modulation of synaptic transmission. *Hippocampus* 7:73-77.

Kier, EL, Kim, JH, Fulbright, RK, Bronen, RA. 1997. Embryology of the human fetal hippocampus: MR imaging, anatomy, and histology. *AJNR Am J Neuroradiol* 18:525-532.

Killackey, HP. 1984. Glia and the elimination of transient cortical projections. *TINS* 7:225-226.

Kimelberg, HK, Norenberg, MD. 1989. Astrocytes. *Scientific American* 260:66-76.

Kimelberg, HK. 1995. Receptors on astrocytes-what possible functions? *Neurochem Int* 26:27-40.

Kimelberg, HK. 1999. Current methods and approaches to studying astrocytes: a forum position paper. *Neurotoxicology* 20:703-712.

Kimelberg, HK, Cai, Z, Rastogi, P, Charniga, CJ, Goderie, S, Dave, V, Jalonen, TO. 1997. Transmitter-induced calcium responses differ in astrocytes acutely isolated from rat brain and in culture. *J Neurochem* 68:1088-1098.

Kingston, A, Burnett, J, Mayne, N, Lodge, D. 1995. Pharmacological analysis of 4 - carboxyphenylglycine derivatives: comparison of effects on mGluR1 α and mGluR5a subtypes. *Neuropharm* 34:887-894.

Kostenis, E, Zeng, FY, Wess, J. 1998. Functional characterization of a series of mutant G protein α subunits displaying promiscuous receptor coupling properties. *J Biol Chem* 273:17886-17892.

Kraig, RP, Ferreira-Filho, CR, Nicholson, C. 1983. Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J Neurophysiol* 49:831-850.

Kuchler-Bopp, S, Delaunoy, JP, Artault, JC, Zaepfel, M, Dietrich, JB. 1999. Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport* 10:1347-1353.

Kuffler, SW, Nicholls, JG, Martin, AR. 1984. *From brain to neuron*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Kunkel, DD, Lacaille, J-C, Schwartzkroin, PA. 1988. Ultrastructure of stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. *Synapse* 2:382-394.

Lacaille, J-C, Mueller, AL, Kunkel, DD, Schwartzkroin, PA. 1987. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 7:1979-1993.

Lazarides, E. 1982. Biochemical and immunocytochemical characterization of intermediate filaments in muscle cells. *Methods Cell Biol* 25Pt B:333-357.

Lemos, JR, Nowycky, MC. 1989. Two types of calcium channels coexist in peptide-releasing vertebrate nerve terminals. *Neuron* 2:1419-1426.

Lerma, J, Kushner, L, Zukin, RS, Bennett, MV. 1989. N-methyl-D-aspartate activates different channels than do kainate and quisqualate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2083-2087.

Llinas, R, Sugimori, M, Silver, RB. 1992. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256:677-679.

Lnenicka, GA, Hong, SJ. 1997. Activity-dependent changes in voltage-dependent calcium currents and transmitter release. *Mol Neurobiol* 14:37-66.

Ma, J, Fill, M, Knudson, CM, Campbell, KP, Coronado, R. 1988. Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science* 242:99-102.

Macdonald, RL, Kapur, J. 1999. Acute cellular alterations in the hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia* 40 Suppl 1:S9-20; discussion S21-22.

MacVicar, BA. 1984. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.

MacVicar, BA, Tse, FWY. 1988. Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured astrocytes. *Glia* 1:359-365.

MacVicar, BA, Hochman, D, Dealy, MJ, Weiss, S. 1991. Modulation of intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by influx through voltage-activated Ca^{2+} channels. *Glia* 4:448-455.

Martin DL. 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5: 81-94.

Martin, DL. 1995. The role of glia in the inactivation of neurotransmitters. In: Kettenman H, Ransom, BR, eds. *Neuroglia*. Oxford, UP.

Masu, M, Tanabe, Y, Tsuchida, K, Shigemoto, R, Nakanishi, S. 1991. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349:760-765.

Mayer, ML, Westbrook, GL. 1987. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28:197-276.

McCarron, JG, Halpern, W. 1990. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol* 259:H902-908.

McCarthy, KD, DeVellis, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendrial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.

McCarthy, KD, Salm, AK. 1991. Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. *Neurosci* 41:325-333.

McCarthy, TR, TanPiengco, PE. 1992. Multiple types of high-threshold calcium channels in rabbit sensory neurons: high-affinity block of neuronal L-type by nimodipine. *J Neurosci* 12:2225-2234.

McCarthy, KD, Porter, JT. 1995. GFAP-positive hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia* 13:101-112.

McCleskey, EW. 1994. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 4:304-312.

McCulloch, J, Edvinsson, L, Watt, P. 1982. Comparison of the effects of potassium and pH on the calibre of cerebral veins and arteries. *Pflugers Arch* 393:95-98.

McKhann II, GM, D'Ambrosio, R, Janigro, D. 1997. Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes. *J Neurosci* 17:6850-6863.

Meldrum, BS. 1994. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44:S14-23.

Melvin, JL. 1965. The action potential. *Arch Phys Med Rehabil* 46:680-688.

Milner, B. 1966. Amnesia following operation on the temporal lobes. In CWM Whitty & OL Zangwill, eds. *Amnesia*. London: Butterworths.

Minturn, JE, Black, JA, Angelides, KJ, Waxman, SG. 1990. Sodium channel expression detected with antibody 7493 in A2B5+ and A2B5- astrocytes from rat optic nerve in vitro. *Glia* 3:358-367.

Mody, I, MacDonald, JF. 1995. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends Pharmacol Sci* 16:356-359.

Monyer, H, Burnashev, N, Laurie, DJ, Sakmann, B, Seeburg, PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.

Moser, EI, Moser, MB. 1999. Is learning blocked by saturation of synaptic weights in the hippocampus? *Neurosci Biobehav Rev* 23:661-672.

Muller, T, Moller, T, Berger, T, Schnitzer, J, Kettenmann, H. 1992. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256:1563-1566.

Muller, T, Moller, T, Neuhaus, J, Kettenmann, H. 1996. Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia* 17:274-284.

Murphy, S, Pearce, B. 1987. Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neurosci* 22:381-394.

Murphy, S, Simmons, ML, Agullo, L, Garcia, A, Feinstein, DL, Galea, E, Reis, DJ, Minc-Golomb, D, Schwartz, JP. 1993. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* 16:323-328.

Nakahara, K, Okada, M, Nakanishi, S. 1997. The metabotropic glutamate receptor mGluR5 induces calcium oscillations in cultured astrocytes via protein kinase C phosphorylation. *J Neurochem* 69:1467-1475.

Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.

Nakanishi, S, Nakajima, Y, Masu, M, Ueda, Y, Nakahara, K, Watanabe, D, Yamaguchi, S, Kawabata, S, Okada, M. 1998. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 26:230-235.

Nathanson, MH, Burgstahler, AD, Mennone, A, Fallon, MB, Gonzalez, CB, Saez, JC. 1995. Ca^{2+} waves are organized among hepatocytes in the intact organ. *Am J Physiol* 269:G167-G171.

Nedergaard, M. 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.

Nelson, N. 1998. The family of Na^+/Cl^- neurotransmitter transporters. *J Neurochem* 71:1785-1803.

Newman, EA. 1986. High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233:453-454.

Newman, EA. 1993. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 13:3333-3345.

Newman, EA, Zahs, KR. 1998. Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18:4022-4028.

Nilsson, M, Hansson, E, Ronnback, L. 1991. Heterogeneity among astroglial cells with respect to 5HT-evoked cytosolic Ca²⁺ responses. A microspectrofluorimetric study on single cells in primary culture. *Life Sci* 49:1339-1350.

Nixdorf-Bergweiler, BE, Albrecht, D, Heinemann, U. 1994. Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12:180-95.

Nowak, L, Bregestovski, P, Ascher, P, Herbet, A, Prochiantz, A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.

Oh, Y, Waxman, SG. 1995. Differential Na⁺ channel beta 1 subunit mRNA expression in stellate and flat astrocytes cultured from rat cortex and cerebellum: a combined *in situ* hybridization and immunocytochemistry study. *Glia* 13:166-173.

Orkand, RK, Nichols, JG, Kuffler, SW. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the CNS of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.

Ozawa, S, Kamiya, H, Tsuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.

Palmada, M, Centelles, JJ. 1998. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Front Biosci* 3:D701-D718.

Parpura, V, Basarsky, TA, Liu, F, Jeftinija, K, Jeftinija, S, Haydon, PG. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.

Parpura V, Fang Y, Basarsky T, Jahn R, Haydon PG. 1995. Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett* 377:489-492.

Pasantés-Morales, H, Moran, J, Schousboe, A. 1990. Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3:427-432.

Pasti, L, Volterra, A, Pozzan, T, Carmignoto, G. 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 17:7817-7830.

Patneau, DK, Vyklicky, L Jr, Mayer, ML. 1993. Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate. *J Neurosci* 13:3496-3509.

Paulson, OB, Newman, EA. 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237:896-898.

Pekny, M, Stanness, KA, Eliasson, C, Betsholtz, C, Janigro, D. 1998. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* 22:390-400.

Peters, A, Palay, SL, Webster, HD. 1976. The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. W.B. Saunders Co.: New York.

Pfrieger, FW, Barres, BA. 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro*. *Science* 277:1684-1687.

Pixley, SK, deVellis, J. 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* 317:201-209.

Plesnila, N, Ringel, F, Chang, RC, Staub, F, Bathmann, A. 1998. Relevance of calcium homeostasis in glial cell swelling from acidosis. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 71:203-205.

Porter, JT, McCarthy, KD. 1995. Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes *in situ*. *J Neurochem* 65:1515-1523.

Porter, JT, McCarthy, KD. 1996. Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. J Neurosci 16:5073-5081.

Porter JT, McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. Prog in neurobiol 51:439-455.

Prezeau, L, Manzoni, O, Homburger, V, Sladeczek, F, Curry, K, Bockaert, J. 1992. Characterization of a metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 89:8040-8044.

Quandt, FN, MacVicar, BA. 1986. Calcium activated potassium channels in cultured astrocytes. Neuroscience 19:29-41.

Queiroz, G, Meyer, DK, Meyer, A, Starke, K, Von Kügelgen, I. 1999. A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. Neurosci 91:1171-1181.

Rakic, P. 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electromicroscopic study in Macacus rhesus. J Comp Neurol 141:283-312.

Ramon y Cajal, S. 1911. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés, Vol. 2. Paris, Maloine.

Rane, SG, Holz, GG 4th, Dunlap, K. 1987. Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release. Pflugers Arch 409:361-366.

Ransom, BR, Yamate, CL, Connors, BW. 1985. Activity-dependent shrinkage of extracellular space in rat optic nerve: a developmental study. J Neurosci 5:532-535.

Ransom, RW, Stec, NL. 1988. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem* 51:830-836.

Ransom, BR, Walz, W, Davis, PK, Carlini, WG. 1992. Anoxia-induced changes in extracellular K^+ and pH in mammalian central white matter. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:593-602.

Ravin, R, Spira, ME, Parnas, H, Parnas, I. 1997. Simultaneous measurement of intracellular Ca^{2+} and asynchronous transmitter release from the same crayfish bouton. *J Physiol (Lond)* 501:251-262.

Reese, KA, Caldwell, JH. 1999. Immunocytochemical localization of NaCh6 in cultured spinal cord astrocytes. *Glia* 26:92-96.

Reier, PJ. 1986. Gliosis following CNS injury: The anatomy of astrocytic scars and their influence on axonal elongation. In: *Astrocytes: Cell biology and pathology of astrocytes*, Vol. 3. S. Federoff and A. Vernadakis, eds. Academic Press, Orlando, Florida.

Rio Hortega, PD. 1918. Noticias de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 15:367-378.

Rio Hortega, PD. 1928. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. *Mem R Soc Esp Hist Nat* 14:5-122.

Risau, W, Esser, S, Engelhardt, B. 1998. Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol Biol (Paris)* 46:171-175.

Robitaille, R. 1995. Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15:7121-7131.

Robitaille, R. 1998. Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.

Robitaille, R, Bourque, MJ, Vandaele, S. 1996. Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 16:148-158.

Robitaille, R, Jahromi, BS, Charlton, MP. 1997. Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 504:337-347.

Rose, CR, Deitmer, JW. 1994. Evidence that glial cells modulate extracellular pH transients induced by neuronal activity in the leech central nervous system. *J Physiol (Lond)* 481:1-5.

Rothstein, JD, Dykes-Hoberg, M, Pardo CA, Bristol, LA, Jin L, Kunczi, RW, Kanai, Y, Hediger, MA, Wang, Y, Schielke, JP, Welty, DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.

Rowe, JS, Ruddock, KH. 1982. Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists. *Neurosci Lett* 30:257-262.

Rubin, RP. 1970. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol Rev* 22:389-428.

Rubin, LL, Staddon, JM. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22:11-28.

Ryo, Y, Miyawaki, A, Furuichi, T, Mikoshiba, K. 1993. Immunohistochemical localization of metabotropic and ionotropic glutamate receptors in the mouse brain. *Ann N Y Acad Sci* 707:554-556.

Scemes, E, Dermietzel, R, Spray, DC. 1998. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia* 24:65-73.

Scheetz, AJ, Constantine-Paton, M. 1994. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J* 8:745-752.

Schoepp, DD, Johnson, BG. 1993. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. *Neurochem Int* 22:277-283.

Schwartz, JP, Mishler, K. 1990. Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 10:447-457.

Seeburg, PH. 1993. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16:359-365.

Seifert, G, Steinhäuser, C. 1995. Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca^{2+} permeability. *Eur J Neurosci* 7:1872-1881.

Seifert, G, Rehn, L, Weber, M, Steinhäuser, C. 1997. AMPA receptor subunits expressed by single astrocytes in the juvenile mouse hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 47:286-294.

Seifert, G, Zhou, M, Steinhäuser, C. 1997. Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol* 78:2916-2923.

Shao Y, McCarthy KD. 1994. Plasticity of astrocytes. *Glia* 11:147-155.

Shao Y, McCarthy KD. 1997. Response of Bergmann glia and granule neurons *in situ* to N-methyl-D-aspartate, norepinephrine, and high potassium. *J Neurochem* 68:2405-2411.

Shelton, MK, McCarthy, KD. 1999. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors *in situ*. *Glia* 26:1-11.

Sieber, FE, Wilson, DA, Hanley, DF, Traystman, RJ. 1993. Extracellular potassium activity and cerebral blood flow during moderate hypoglycemia in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 264:H1774-1780.

Singh, I . 1964. The basis of excitation and action potential in muscle and nerve. *Arch Int Physiol Biochim* 72:378-394.

Smirnova, T, Stinnakre, J, Mallet, J. 1993. Characterization of a presynaptic glutamate receptor. *Science* 262:430-433.

Smith, S. 1992. Do astrocytes process neural information? *Progress in brain research* 94:119-136.

Somjen, GG. 1988. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1:2-9.

Sontheimer, H, Minturn, JE, Black, JA, Ransom, BR, Waxman, SG. 1991. Two types of Na⁺-currents in cultured rat optic nerve astrocytes: changes with time in culture and with age of culture derivation. *J Neurosci Res* 30:275-287.

Stagaard, M, Balslev, Y, Lundberg, JJ, Møllgaard, K. 1987. Microglia in the hypendyma of the rat subcommissural organ following brain lesion with serotonin neurotoxin. *J Neurocytol* 16:131-142.

Steinhäuser, C, Jabs, R, Kettenmann, H. 1994. Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 4:19-36.

Steinhäuser, C, Gallo, V. 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 19:339-345.

Stitt, TN, Gasser, UE, Hatten, ME. 1991. Molecular mechanisms of glial-guided neuronal migration. *Ann N Y Acad Sci* 633:113-121.

Storck, T, Schulte, S, Hofmann, K, Stoffel, W. 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10955-10959.

Struijker Boudier, HA, Messing, MW, van Essen, H. 1992. Preferential small arteriolar vasodilatation by the potassium channel opener, BRL 38227, in conscious spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 218:191-193.

Szuchet, S. 1995. The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. In: *Neuroglia*. H Kettenman and BR Ransom (eds). Oxford University Press, New York.

Szuchet, S, Polak, PE, Yim, SH, Arvanitis, D. 1988. Plasma membrane of cultured oligodendrocytes: III. Relatedness to myelin. *Glia* 1:141-150.

Tanabe, Y, Masu, M, Ishii, T, Shigemoto, R, Nakanishi, S. 1992. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8:169-179.

Tanaka, H, Araki, M, Masuzawa, T. 1992. Reaction of astrocytes in the gerbil hippocampus following transient ischemia: immunohistochemical observations with antibodies against glial fibrillary acidic protein, glutamine synthetase, and S-100 protein. *Exp Neurol* 116:264-274.

Tsubokawa, T, Katayama, Y, Kondo, T, Ueno, Y, Hayashi, N, Moriyasu, N. 1980. Changes in cerebral blood flow and neuronal activity during sensory stimulation in normal and sympathectomized cats. *Brain Res* 190:51-64.

Tymianski, M, Charlton, MP, Carlen, PL, Tator, CH. 1993. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* 13:2085-2104.

Usherwood, PN, Machili, P, Leaf, G. 1968. L-Glutamate at insect excitatory nerve-muscle synapses. *Nature* 219:1169-1172.

Venance, L, Stella, N, Glowinski, J, Giaume, C. 1997. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:1981-1992.

Venance, L, Premont, J, Glowinski, J, Giaume, C. 1998. Gap junctional communication and pharmacological heterogeneity in astrocytes cultured from the rat striatum. *J Physiol (Lond)* 510:429-440.

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

Verkhratsky, A, Kettenman, H. 1996. Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 19:346-352.

Verkhratsky, A, Orkand, RK, Kettenmann, H. 1998. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.

Vernadakis A. 1996. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog in neurobiol* 49:185-214.

Vornov, JJ, Coyle, JT. 1991. Glutamate neurotoxicity and the inhibition of protein synthesis in the hippocampal slice. *J Neurochem* 56:996-1006.

Walz, W, Wuttke, W, Hertz, L. 1984. Astrocytes in primary cultures: membrane potential characteristics reveal exclusive potassium conductance and potassium accumulator properties. *Brain Res* 292:367-374.

Walz, W, Lang, MK. 1998. Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* 257:127-130.

Waxman, SG, Sims, TJ. 1984. Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain Res* 292:179-185.

Weruaga-Prieto, E, Egli, P, Celio, MR. 1996. Topographic variations in rat brain oligodendrocyte morphology elucidated by injection of Lucifer Yellow in fixed tissue slices. *J Neurocytol* 25:19-31.

Williams, S, Samulack, DD, Beaulieu, C, Lacaille, J-C. 1994. Membrane properties and synaptic responses of interneurons located near the stratum lacunosum-moleculare/radiatum border of area CA1 in whole-cell recordings from rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 71:2217-2235.

Wilson, JR, Kapoor, SC, Krishna, GG. 1994. Contribution of potassium to exercise-induced vasodilation in humans. *J Appl Physiol* 77:2552-2557.

Wolff, JR. 1970. The astrocyte as link between capillary and nerve cell. *Triangle* 9:153-164.

Woodhall, G, Gee, CE, Robitaille, R, Lacaille, J-C. 1999. Membrane potential and intracellular Ca^{2+} oscillations activated by mGluRs in hippocampal stratum oriens/alveus interneurons. *J Neurophysiol* 81:371-382.

Yamakura, T, Shimoji, K. 1999. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59:279-298.

Yamamoto, F, Borgula, GA, Steinberg, RH. 1992. Effects of light and darkness on pH outside rod photoreceptors in the cat retina. *Exp Eye Res* 54:685-697.

Yarom, M, Zurgil, N, Zisapel, N. 1985. Calcium permeability changes and neurotransmitter release in cultured brain neurons. II. Temporal analysis of neurotransmitter release. *J Biol Chem* 260:16294-16302.

Zhang, SC, Fedoroff, S. 1996. Neuron-microglia interactions in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)* 91:385-395.

Zhang, S, Trussell, LO. 1994. A characterization of excitatory postsynaptic potentials in the avian nucleus magnocellularis. *J Neurophysiol* 72:705-718.

Ziak D, Chvatal A, Sykova E. 1998. Glutamate-, kainate- and NMDA-evoked membrane currents in identified glial cells in rat spinal cord slice. *Physiol Res* 47:365-375.