

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Interaction entre cellules gliales et neurones au niveau du système nerveux central:
rôle dans la modulation synaptique et mécanismes d'activation des astrocytes par
les récepteurs NMDA.

Par
Alexandre Serrano

Département de physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor*
en sciences neurologiques

février, 2008

© Alexandre Serrano 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Interaction entre cellules gliales et neurones au niveau du système nerveux central:
rôle dans la modulation synaptique et mécanismes d'activation des astrocytes par
les récepteurs NMDA.

présentée par :
Alexandre Serrano

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Vincent Castellucci, président-rapporteur
M. Richard Robitaille, directeur de recherche
M. Jean-Claude Lacaille, codirecteur de recherche
M. Louis-Éric Trudeau, membre du jury
M. Jaideep Bains, examinateur externe
Mme. Arlette Kolta, représentante du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Dans le système nerveux, la transmission de l'information ou transmission synaptique a lieu à une structure spécialisée appelée la synapse. Les astrocytes sont maintenant considérés comme les partenaires des neurones dans la transmission synaptique. Deux types d'astrocytes, les cellules GluT et GluR, sont présents dans l'hippocampe. La plasticité synaptique est une modification persistante de l'efficacité synaptique et une propriété fondamentale de la transmission synaptique. Des événements de plasticité synaptique, comme la potentialisation à long terme et le phénomène parallèle de la dépression hétérosynaptique, sont à la base des mécanismes d'apprentissage et de la mémoire. Des observations récentes suggèrent que les astrocytes contribuent à la potentialisation à long terme dans l'hippocampe mais aucune étude n'a considéré la possibilité que les astrocytes pourraient jouer un rôle dans la dépression hétérosynaptique. Cette thèse montre pour la première fois que la contribution des astrocytes de type GluT est nécessaire à l'induction de la dépression hétérosynaptique, un phénomène qui dépend des récepteurs NMDA du glutamate. De manière intéressante, l'application de NMDA active les astrocytes de type GluT et GluR par des mécanismes différents. Ces résultats suggèrent que les récepteurs NMDA sont non seulement importants pour la transmission synaptique entre neurones mais qu'ils contribuent aussi à l'activation des astrocytes. Enfin, les travaux de cette thèse démontrent que les astrocytes participent activement au transfert et à l'entreposage d'information dans le système nerveux central.

MOTS CLÉS EN FRANÇAIS

hippocampe, astrocytes, interneurones, transmission synaptique, plasticité synaptique, dépression hétérosynaptique, récepteurs NMDA, récepteurs GABA_B, ATP, adénosine.

ABSTRACT

In the nervous system, information transmission or synaptic transmission happens at a specialized structure called the synapse. Astrocytes are now believed to be partners with neurons in synaptic transmission. Two types of astrocytes, GluT and GluR cells, are present in the hippocampus. Synaptic plasticity is a modulation of synaptic efficacy and a fundamental property of synaptic transmission. Synaptic plasticity mechanisms, like long-term potentiation and its parallel phenomenon heterosynaptic depression, are believed to underlie information storage in the central nervous system. Some evidence suggest that astrocytes contribute to long-term potentiation in the hippocampus but an involvement of astrocytes in heterosynaptic depression has never been tested. In this thesis evidence is provided that GluT astrocyte activation is necessary for heterosynaptic depression, an NMDA glutamate receptor dependent phenomenon. Interestingly, NMDA application activates GluT and GluR astrocytes through different mechanisms. Our findings indicate that NMDA receptors are not only involved in neuronal synaptic transmission but that they are also key elements in astrocytic activation. Finally, this work demonstrates that astrocytes are also active participants in the transfer and storage of information in the central nervous system.

ENGLISH KEY WORDS

hippocampus, astrocytes, interneurons, synaptic transmission, synaptic plasticity, heterosynaptic depression, NMDA receptors, GABA_B receptors, ATP, adenosine.

Je crois qu'écrire c'est prendre la mesure de ce qu'on ne se rappellera pas,
de ce qu'on ne retiendra pas. Écrire, c'est tenter de boucher les trous du
réel évanescant avec des bouts de ficelles, faire des nœuds dans des voiles
transparents en sachant que ça se déchirera ailleurs. Écrire ça se fait
contre la mémoire et non pas avec.

Martin Winckler, *La maladie de Sashs*

Si chaque seconde de notre vie devait se répéter un nombre infini de fois,
[...] chaque geste porterait le poids d'une insoutenable responsabilité.
C'est ce qui faisait dire à Nietzsche que l'idée de l'éternel retour est le plus
grand fardeau. Si l'éternel retour est le plus grand fardeau, nos vies, sur
cette toile de fond, peuvent apparaître dans leur splendide légèreté.

Milan Kundera, *L'insoutenable légèreté de l'être*.

L'éternité c'est long, surtout vers la fin.

Woody Allen, *The insanity defense*.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, M. Jaideep Bains de l'Université d'Alberta, M. Louis-Éric Trudeau de l'Université de Montréal, Mme Arlette Kolta de l'Université de Montréal et M. Vincent Castellucci de l'Université de Montréal d'avoir accepté de lire et examiner cette thèse.

Je remercie sincèrement mes directeurs de recherche, M. Jean-Claude Lacaille et M. Richard Robitaille du groupe de recherche sur le système nerveux central, pour la qualité de la formation qu'ils m'ont donnée, le suivi qu'ils ont assuré sur mon cheminement et les nombreuses opportunités qu'ils m'ont ouvertes. De eux j'espère retenir toujours leur passion pour la science, leur intégrité et leur rigoureux souci du détail.

Je voudrais aussi remercier Mme. France Morin et Mme. Joanne Vallée, qui sont les véritables clefs de voûte de leurs laboratoires respectifs. Leurs conseils, trucs, et solutions ainsi que leur disponibilité tout au long de mon doctorat m'ont été d'une aide irremplaçable.

Un merci particulier à Mme. Aude Panatier pour son temps, ses conseils toujours justes et sa vision de synthèse, aide précieuse pendant la phase périlleuse de la rédaction. Je remercie Mme. Julie Pepin pour son assistance technique efficace. Je remercie aussi M. Keith Todd d'avoir collaboré avec moi dans la rédaction de l'article *Glial cells in synaptic plasticity*. Je remercie M. George Elvira et Mme. Maria Sanchez de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec eux sur le déplacement des granules d'ARN. Je remercie mes colocataires de bureau, M. Mathieu Bourdeau et M. Thomas Michelet pour les discussions, souvent philosophiques. Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire : Mme Audrey Pinard, Mme. Éve-Lyne Belair, Mme. Isabelle Rousse, M. Keith Todd, M. Mathieu Bourdeau, M. Maxence Levasseur, Mme. Nathalie Sanon, Mme. Delphine Gobert, M. Fred Bouthillette, Mme. Geneviève Lebeau, Mme. Isabel Laplante, M. Nasser Haddjeri, Mme. Mounia Azzi et M. Patrice Congar. Je garderai des bons souvenirs des deux équipes.

On néglige souvent l'importance de notre vie personnelle dans nos réalisations professionnelles. Je tiens donc à remercier mes parents, Sonsoles et Ricardo, qui m'ont inculqué la curiosité pour la vie qui est derrière la science. Leur support est toujours inconditionnel. Merci à David, ami inséparable. Merci à Ana qui me rappelle tout les soirs l'importance d'oublier. Finalement, je voudrais témoigner ma profonde gratitude envers Nadine, avec qui je partage ma vie et qui a su me comprendre et me supporter pendant les moments les plus difficiles. Son soutien indéfectible est déterminant de ma réussite.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
MOTS CLÉS EN FRANÇAIS	IV
ABSTRACT	V
ENGLISH KEY WORDS	VI
REMERCIEMENTS	VIII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVIII
1 PRÉAMBULE	1
2 INTRODUCTION	2
2.1 CONTRIBUTION DU LOBE TEMPORAL AUX PROCESSUS MNÉSQUES	2
2.1.1 Études neuropsychologiques	2
2.1.1.1 Différentes formes de mémoire	4
2.1.1.1.1 Mémoire implicite	4
2.1.1.1.2 Mémoire explicite	5
2.1.1.2 Rôle particulier de l'hippocampe dans la mémoire	6
2.1.2 Les théories sur la consolidation de la mémoire dans le neocortex	8
2.2 ORGANISATION DE LA FORMATION HIPPOCAMPIQUE	11
2.2.1 cellules principales et systèmes de fibres	13
2.2.1.1 Gyrus dentelé et fibres moussues	14
2.2.1.2 CA3 et collatérales de Schaffer	15
2.2.1.3 CA1 et connexions avec le subiculum	16
2.2.1.4 Subiculum, présubiculum et parasubiculum	18
2.2.1.5 Cortex entorhinal, voies perforante, temporoammonique et projections vers le CA3	18
2.2.1.6 Connectivité de l'hippocampe et transfert d'information	19
2.2.1.7 Connexions sous-corticales	22
2.2.2 réseau inhibiteur de l'hippocampe	23
2.2.2.1 Caractéristiques dendritiques des interneurones	24
2.2.2.2 Diversité des interneurones de l'hippocampe	24
2.2.2.2.1 Interneurones axo-axoniques (PV+)	27
2.2.2.2.2 Interneurones à panier (PV+, CCK-)	28
2.2.2.2.3 Interneurones à panier (PV-, CCK+, VIP-, VGLUT3+)	28
2.2.2.2.4 Interneurones à panier (PV-, CCK+, VIP+, VGLUT3-)	28
2.2.2.2.5 Interneurones bistratifiés (PV+, somatostatine+, NPY+, GABAA+, CCK-)	28
2.2.2.2.6 Interneurones O-LM (PV+, somatostatine+, mGluR1a+, input presynaptique mGluR7a+)	29
2.2.2.2.7 Interneurones associés aux collatérales de Schaffer (CCK+, calbindine+, somatostatine-, NPY-)	29
2.2.2.2.8 Interneurones de la couche <i>lacunosum moleculare</i>	29

2.2.2.2.9	Interneurones neurogliaforme.....	30
2.2.2.2.10	Interneurones trilaminaires (récepteur m2+, mGluR8a présynaptique, calbindin-).	30
2.2.2.2.11	Interneurones de rétroprojection.	30
2.2.2.2.12	Interneurones de projection hippocamposéptal (calbindine+, somatostatine+).	30
2.2.2.2.13	Interneurones spécifiques aux interneurones.	31
2.2.2.3	Fonction des interneurones de la région CA1	31
2.2.2.3.1	Inhibition proactive.....	31
2.2.2.3.2	Inhibition rétroactive	32
2.2.2.3.3	Inhibition mixte.....	32
2.2.2.3.4	Régulation de l'activité oscillatoire	33
2.3	TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS LA RÉGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE	34
2.3.1.1	Zone active et libération présynaptique de neurotransmetteurs.....	34
2.3.1.2	Densité postsynaptique et récepteurs	36
2.3.1.2.1	Récepteurs au glutamate	36
2.3.1.2.1.1	Les récepteurs ionotropes au glutamate.....	37
2.3.1.2.1.2	La structure des récepteurs ionotropes au glutamate.	38
2.3.1.2.1.3	Les récepteurs métabotropes au glutamate.....	40
2.3.1.2.2	Les récepteurs au GABA	41
2.3.1.2.2.1	Les récepteurs ionotropes au GABA	42
2.3.1.2.2.2	Les récepteurs métabotropes au GABA.....	43
2.3.1.2.3	Récepteurs à l'adénosine.....	44
2.3.1.2.4	Récepteurs à l'ATP.....	45
2.4	PLASTICITÉ SYNAPTIQUE COMME MÉCANISME CELLULAIRE DE LA MÉMOIRE	46
2.4.1	Potentialisation à long-terme.....	47
2.4.1.1	Relation entre la PLT et la mémoire.....	48
2.4.1.2	Les mécanismes qui soutendent la PLT	48
2.4.2	Dépression à long-terme	52
2.4.3	Dépression hétérosynaptique.....	53
2.5	CELLULES GLIALES.....	56
2.5.1	Différents types de cellules gliales	56
2.5.1.1	Les cellules microgliales	56
2.5.1.2	Les oligodendrocytes	56
2.5.1.3	Les astrocytes	57
2.5.1.3.1	Différenciation des populations d'astrocytes de l'hippocampe	58
2.5.1.3.1.1	Identification immunocytochimique.....	58
2.5.1.3.1.2	Identification à l'aide d'un transgène.....	60
2.5.1.3.1.3	Identification avec des molécules marqueurs.....	60
2.5.1.3.1.4	Identification biophysique	60
2.5.2	Rôles des astrocytes dans le système nerveux central	63
2.5.2.1	Les astrocytes : cellules de soutien.....	63
2.5.2.2	Rôle dans le développement.....	63
2.5.2.3	Les astrocytes et la neurogenèse	63
2.5.2.4	Rôle dans la synaptogenèse, la survie et le développement neuronal	63
2.5.2.5	Rôle dans le métabolisme du glucose et du glycogène.....	64
2.5.2.6	Les astrocytes et le maintien de l'homéostasie ionique extracellulaire	64
2.5.2.7	Les astrocytes, la barrière hémato-encéphalique et le contrôle de la microcirculation	64
2.5.2.8	Rôles des astrocytes dans le fonctionnement de la synapse.....	65
2.5.2.8.1	Les astrocytes contactent la synapse.....	65
2.5.2.8.2	Les astrocytes sont des cellules excitables.....	67

2.5.2.8.2.1	L'homéostasie calcique dans les astrocytes	68
2.5.2.8.3	Les astrocytes sont sensibles à l'activité synaptique.....	72
2.5.2.8.3.1	Récepteurs AMPA astrocytaires	72
2.5.2.8.3.2	Récepteurs mGluR	72
2.5.2.8.3.3	Récepteurs NMDA.....	73
2.5.2.8.3.4	Récepteurs à l'adénosine A ₁ , et A ₂	73
2.5.2.8.3.5	Récepteurs GABA _A	74
2.5.2.8.3.6	Récepteurs GABA _B	74
2.5.2.8.3.7	Récepteurs à l'ATP.....	75
2.5.2.8.4	Les astrocytes modulent l'activité de la synapse : le concept de synapse tripartite	75
2.5.2.8.4.1	Les astrocytes contrôlent le glutamate libre à la synapse	79
2.5.2.8.4.2	Relation entre les astrocytes et la concentration d'adénosine extracellulaire.....	81
2.5.2.8.4.3	Connectivité entre les astrocytes	82
3	BUT DE LA THÈSE	87
4	PREMIER CHAPITRE DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	91
4.1	GABAERGIC NETWORK ACTIVATION OF GLIAL CELLS UNDERLIES HIPPOCAMPAL HETEROSYNAPTIC DEPRESSION ...	93
4.1.1	Abstract	93
4.1.2	Introduction	94
4.1.3	Materials and Methods.....	96
4.1.3.1	Hippocampal slices	96
4.1.3.2	Confocal Microscopy and Ca ²⁺ Imaging.....	96
4.1.3.3	Electrophysiology	98
4.1.3.4	Histology	99
4.1.3.5	Statistical Analysis.....	100
4.1.4	Results	100
4.1.4.1	Ca ²⁺ -mediated activation of glial cells during heterosynaptic depression	100
4.1.4.2	Can heterosynaptic depression be mimicked pharmacologically ?	102
4.1.4.3	Is Ca ²⁺ -mediated activation of glial cells necessary for heterosynaptic depression ?	103
4.1.4.4	Indirect mechanism of glial cell activation during NMDA-induced synaptic depression	105
4.1.4.5	Role of GABA in heterosynaptic depression and activation of glial cells	106
4.1.4.6	Is Ca ²⁺ -mediated activation of glial cells necessary for NMDA or baclofen-induced depression ?	108
4.1.4.7	Adenosine A1 receptor involvement in heterosynaptic depression but not in glial cell activation	110
4.1.5	DISCUSSION.....	112
4.1.5.1	Glial cell activation is necessary for heterosynaptic depression.....	112
4.1.5.2	Heterosynaptic depression emerges from the cooperation between neuronal and glial networks	115
4.1.5.3	Roles of glial cells in plasticity	116
4.1.5.4	Perspectives	116
4.1.6	REFERENCES	117
4.1.7	Figures and legends	122
4.1.8	Supplemental data.....	140
5	DEUXIÈME CHAPITRE DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	142

5.1	ASTROCYTE SUBTYPE-SPECIFIC MODULATION BY NMDA IN MOUSE HIPPOCAMPUS.....	143
5.1.1	Abstract	144
5.1.2	Introduction	144
5.1.3	Materials and methods	147
5.1.3.1	Hippocampal slice preparation.....	147
5.1.3.2	Electrophysiological recordings of astrocytes.....	147
5.1.3.3	Confocal Microscopy and Ca ²⁺ Imaging	149
5.1.3.4	Glial syncytium	150
5.1.3.5	Statistical Analysis.....	150
5.1.4	Results	151
5.1.4.1	Identification of astrocytes.....	151
5.1.4.2	NMDA-induced Ca ²⁺ responses in astrocytes.....	152
5.1.4.3	NMDA receptor-mediated modulation of homotypic glial cell coupling.....	154
5.1.4.4	Effects of NMDA on membrane properties.....	155
5.1.4.5	NMDA-induced activation of GluT and GluR cells involve different mechanisms.....	157
5.1.4.6	NMDA-induced responses in GluT astrocytes require an indirect GABAergic contribution.....	159
5.1.4.7	NMDA-induced responses in GluR astrocytes do not involve a GABAergic pathway.....	162
5.1.5	Discussion	163
5.1.5.1	Identification of GluT and GluR cells through distinct properties	164
5.1.5.2	Functional NMDA receptors on astrocytes	165
5.1.5.3	Heterogeneous glutamatergic regulation in astrocytes	166
5.1.5.4	GABAergic contribution	167
5.1.5.5	Membrane depolarization.....	168
5.1.5.6	Modulation of cell coupling and membrane resistance by NMDA.....	170
5.1.6	Acknowledgments	171
5.1.7	References	172
5.1.8	Figures and legends	181
6	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	201
6.1	BREF RAPPEL DE L'ÉTAT DE LA QUESTION.....	201
6.2	CE QUE CETTE THÈSE A MONTRÉ	202
6.3	RÔLES DU NMDA : DE L'ACTIVATION ASTROCYTAIRE À L'INDUCTION DE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE.....	203
6.3.1	les astrocytes de l'hippocampe possèdent-ils des récepteurs NMDA ?	204
6.3.2	Le NMDA active les astrocytes par différentes modalités.....	206
6.3.3	Intégration des différentes modalités d'activation.....	210
6.3.4	Liens entre les différentes modalités d'activation des astrocytes et l'induction de la dépression hétérosynaptique ?	211
6.3.4.1	La dépolarisation membranaire des astrocytes est-elle nécessaire à l'induction de la dépression hétérosynaptique ?.....	211
6.3.4.2	Le couplage des astrocytes est-il nécessaire à l'induction de la dépression hétérosynaptique ?.....	211
6.3.5	Les astrocytes de type GluT induisent la dépression hétérosynaptique	212

6.4	INTERACTIONS NEURONE-GLIE, SYNCYTIUM ASTROCYTAIRE ET DÉPRESSION HÉTÉRO-SYNAPTIQUE.....	214
6.4.1	Syncytium astrocytaire et plasticité synaptique	214
6.4.2	Le syncytium astrocytaire établit un contraste synaptique de type centre-périphérie pendant la dépression hétérosynaptique	216
6.4.3	Limites du syncytium astrocytaire et étendue de la dépression hétérosynaptique	218
6.4.4	Relation numérique entre les astrocytes, les synapses et la dépression hétérosynaptique ?	219
6.4.4.1	Comparaison entre l'étendue du syncytium astrocytaire et les synapses affectées par la dépression hétérosynaptique	219
6.4.4.2	Combien d'astrocytes sont nécessaires pour produire la dépression hétérosynaptique ?.....	221
6.4.5	Deux formes de dépression hétérosynaptique astrocytaire	221
6.5	QU'ELLE EST L'IMPORTANCE DU RÉSEAU GABAERGIQUE DANS L'ACTIVATION DES ASTROCYTES ET DANS LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?	222
6.5.1	Comment les récepteurs GABA _B induisent des élévations calciques dans les astrocytes ?.....	223
6.5.2	Quels sont les interneurons impliqués dans l'activation des astrocytes lors de la dépression hétérosynaptique ?.....	224
6.6	LES ASTROCYTES COMME SOURCE D'ATP/ADÉNOSINE : LE DOUBLE RÔLE DE L'ATP DANS LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE	225
6.7	CONTRIBUTION PARALLÈLE DES ASTROCYTES À LA PLT ET À LA DÉPRESSION HÉTÉRO-SYNAPTIQUE.....	226
6.7.1	Est-ce qu'un même astrocyte peut contribuer à la PLT et à la dépression hétérosynaptique ?.....	226
6.7.2	Est-ce qu'un même astrocyte peut libérer plusieurs gliotransmetteurs ?	226
6.8	RÔLE DES ASTROCYTES DANS LES MÉCANISMES D'APPRENTISSAGE ET DE MÉMOIRE.....	227
6.9	PERSPECTIVES	228
6.9.1	L'activation calcique des astrocytes est-elle suffisante pour induire la dépression hétérosynaptique ?.....	229
6.9.2	Qu'elle est la contribution des différents types d'astrocytes à la plasticité synaptique ?.....	229
6.9.3	Qu'elle est la contribution du syncytium à différentes formes de plasticité synaptique ?.....	230
6.9.4	Qu'elle est la relation entre la PLT et la dépression hétérosynaptique ?	230
6.9.5	Vérification de l'expression des récepteurs NMDA par les astrocytes de l'hippocampe	231
7	CONCLUSION.....	232
8	RÉFÉRENCES.....	233

9 ANNEXE259

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Agonistes et antagonistes usuels des récepteurs au glutamate.	36
Tableau II.	Agonistes et antagonistes usuels des récepteurs au GABA.	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Systèmes de mémoire à long terme.....	4
Figure 2.	Théorie classique de la consolidation de la mémoire dans le néocortex.	9
Figure 3.	Organisation de la formation hippocampique.....	12
Figure 4.	Cellule pyramidale de la région CA1 et distribution des afférences glutamatergiques.	17
Figure 5.	Traitement de l'information en canaux indépendants.....	21
Figure 6.	Connexions sérielles et parallèles dans l'hippocampe.....	22
Figure 7.	Distribution dendritique et axonale d'un interneurone de la couche <i>lacunosum moleculare</i>	25
Figure 8.	Exemple de la diversité morphologique des interneurons de la région CA1.....	26
Figure 9.	16 sous types d'interneurones dans la région CA1 de l'hippocampe....	27
Figure 10.	Différents mécanismes d'inhibition.....	32
Figure 11.	Organisation de la synapse.	35
Figure 12.	Types de récepteurs au glutamate.	38
Figure 13.	Le blocage par le Mg^{2+} des récepteurs NMDA.....	39
Figure 14.	Types de récepteurs au GABA.....	43
Figure 15.	Mécanismes d'induction de la PLT.	51
Figure 16.	Schéma du mécanisme de la dépression hétérosynaptique selon Manzoni et al., (1994).....	55
Figure 17.	Morphologie de trois types d'astrocytes du système nerveux central.	58
Figure 18.	Identification d'astrocytes dans la couche <i>radiatum</i> de la région CA1.	59
Figure 19.	Organisation ultrastructurale des cellules gliales de la synapse.	66
Figure 20.	Schématisation des voies principales qui contrôlent le calcium cytosolique dans les astrocytes.....	70
Figure 21.	Quatre différents types de modulations que les astrocytes exercent sur l'excitabilité neuronale dans la région CA1 de l'hippocampe.	79
Figure 22.	Mécanismes de vagues calciques.	85
Figure 23.	Les astrocytes jouent-ils un rôle clé dans la dépression hétérosynaptique?.....	88
Figure 24.	Enregistrement simultané de l'activation astrocytaire et des propriétés électrophysiologiques du réseau.....	89
Figure 25.	Relation entre les effets directs et indirects d'une application de NMDA et les différentes modalités d'activation des astrocytes GluT.	208
Figure 26.	Relation entre les effets directs et indirects d'une application de NMDA et les différentes modalités d'activation des astrocytes GluR.	209

Figure 27.	Comparaison entre les propriétés d'activation des astrocytes de type GluT et de type GluR par rapport aux propriétés d'induction de la dépression hétérosynaptique.	213
Figure 28.	Des interactions locales et étendues entre astrocytes et neurones sont à la base de différentes formes de plasticité synaptique.....	216
Figure 29.	Schéma du contraste synaptique centre-périphérie dans la dépression hétérosynaptique.....	218
Figure 30.	Trois niveaux d'interactions entre astrocytes et neurones.	220
Figure 31.	Interaction entre les récepteurs GABA _B et les canaux calciques opérés par les réserves calciques dans des cellules en culture.	223

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA :	acide arachidonique
ACh :	acétylcholine
ACSF :	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AMPA :	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
AP-V :	acide (\pm)-amino-5-phosphopentoanoïque
ARN :	acide ribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
BAPTA :	1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
CA1 :	corne d'Ammon 1
CA2 :	corne d'Ammon 2
CA3 :	corne d'Ammon 3
CA4 :	corne d'Ammon 4
CaMKII :	protéine kinase Ca ²⁺ -calmoduline II
CCK :	cholécystokinine
Cx :	connexine
DAG :	diacylglycérol
DHS :	dépression hétérosynaptique
DLT :	dépression à long-terme
EAAC1 :	<i>excitatory amino acid transporter 1</i>
EGTA :	Ethylene bis(oxyethylene-trinitrilo) tetraacetic acid
EPSP :	<i>excitatory postsynaptic potential</i>
GABA :	acide γ -aminobutyrique
GAD :	décarboxylase de l'acide glutamique
GD :	gyrus dentelé
GFAP :	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP :	<i>green fluorescent protein</i>
GLAST :	<i>Glutamate and aspartate transporter</i>

GLT-1 :	<i>Glutamate transporter 1</i>
IP ₂ :	inositol-bis-phosphate
IP ₃ :	inositol triphosphate
IRM:	imagerie par résonance magnétique
I/V :	courant / voltage
KA :	kainate
mGluR :	récepteur métabotrope au glutamate
NG2 :	protéoglycan2
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NO :	oxyde nitrique
NPY :	neuropeptide Y
O/A :	couche oriens/alvéus
OPC :	cellules précurseurs d'oligodendrocytes
PCR :	<i>polymerase chain reaction</i>
PIV :	polypeptide intestinal vasoactif
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PLC :	phospholipase C
PLT :	potentialisation à long terme
PPSE :	potentiel postsynaptique excitateur
PV :	parvalbumine
SOC :	<i>store operated calcium channels</i>
Sub :	subiculum
TTX :	tetrodotoxine
VGLUT :	<i>vesicular glutamate transporter</i>
VIP :	polypeptide intestinal vasoactif

1 PRÉAMBULE

Le rôle des cellules gliales à longterm a été confiné à une fonction secondaire de soutien dans le système nerveux central mais, dans les dix dernières années, des études pionnières (Araque et al., 1998a; Robitaille, 1998) ont démontré que non seulement les cellules gliales sont sensibles à l'activité neuronale mais elles jouent aussi un rôle essentiel dans le contexte de la transmission synaptique. Dans le cadre de cette thèse, j'ai investigué la possibilité d'une participation des cellules gliales dans la modulation de la transmission synaptique dans une région cérébrale importante pour l'apprentissage et la mémoire.

Afin de présenter le choix du modèle expérimental, l'introduction traite tout d'abord de l'état des connaissances actuelles sur la fonction de l'hippocampe dans la mémoire. Cette section montre l'importance de l'hippocampe dans la mémoire déclarative et confirme le choix de cette structure pour étudier les mécanismes mnésiques. Puisque cette thèse aborde la problématique au niveau cellulaire, il est apparu opportun en second lieu d'introduire l'organisation et la composition cellulaires de l'hippocampe. Ces aspects deviendront capitaux pour la compréhension du rôle des différentes populations de cellules dans les phénomènes synaptiques complexes. Les concepts de la transmission synaptique seront introduits ensuite, en nous centrant particulièrement sur la plasticité de celle-ci ainsi que sur son rôle dans l'apprentissage et dans la mémorisation. Finalement seront présentés les astrocytes (un type de cellule gliale), leur rôle dans le fonctionnement de la synapse et leur contribution à la plasticité synaptique.

Le corps de la thèse démontre que l'activation des astrocytes est nécessaire à l'induction d'une forme particulière de plasticité : la dépression hétérosynaptique dans l'hippocampe. Les travaux de cette thèse contribuent donc à établir les cellules gliales en tant qu'éléments synaptiques fonctionnels, jouant un rôle actif dans la plasticité synaptique que l'on croit importante dans les processus cognitifs.

2 INTRODUCTION

2.1 CONTRIBUTION DU LOBE TEMPORAL AUX PROCESSUS MNÉSQUES

2.1.1 ÉTUDES NEUROPSYCHOLOGIQUES

La recherche du circuit neuronal se trouvant à la base de la mémoire a apporté une question simple à formuler mais d'une grande complexité à répondre : Où est entreposée la mémoire ? Une percée importante a été effectuée dans les années 50.

À cette époque, la résection d'une région du cerveau est effectuée afin de retirer le foyer épileptique à la source des crises intractables par médication habituelle (Scoville, 1954; Milner et Penfield, 1955; Penfield et Milner, 1958; Milner et al., 1998). Brenda Milner entreprit d'étudier les effets de ces résections du lobe temporal sur le comportement des patients. Curieusement, la résection unilatérale du lobe temporal a peu de conséquences sur la mémoire des patients (Milner et Penfield, 1955). Cependant, l'étude de deux d'entre eux dont l'affliction implique bilatéralement le lobe temporal montre que la résection bilatérale du lobe temporal a des conséquences persistantes sur la mémoire (Penfield et Milner, 1958). Brenda Milner est ensuite invitée par William B. Scoville à étudier un de ses patients, H.M., dont la résection bilatérale de la formation hippocampique, l'amygdale et une partie du cortex temporal (Corkin et al., 1997) a causé une amnésie très sévère. Suite à l'opération, les crises épileptiques de H.M. sont mieux contrôlées par la médication et son évaluation démontre que son intelligence générale est favorisée par l'absence de crises (Scoville et Milner, 1957). Nonobstant l'amélioration de son état pathologique, l'évaluation psychologique du patient confirme une amnésie antérograde à long-terme complète et une amnésie rétrograde partielle pour les trois années qui ont précédé son opération (Scoville et Milner, 1957). L'amnésie rétrograde se réfère à la perte d'information mémorisée avant la chirurgie (Squire et Bayley, 2007). L'amnésie antérograde à long-terme est, plutôt, l'incapacité de retenir de l'information au delà du court-terme (Cipolotti

et Bird, 2006). La condition de H.M. est complexe. D'un côté, il retient des nouvelles informations à court-terme mais est incapable de les convertir en mémoire durable à long-terme. De l'autre, sa mémoire rétrograde à long terme (de son enfance) est restée intacte, mais la mémoire d'événements ayant eu lieu quelques temps avant son opération se sont effacés (Scoville et Milner, 1957).

L'analyse du déficit particulier de H.M. par Scoville et Milner en 1957 (Scoville et Milner, 1957) suggère que la mémoire transite par un réseau de neurones particulier (Scoville et Milner, 1957; Squire et Zola-Morgan, 1991). Les conclusions tirées de l'étude de Milner sont d'une importance fondamentale pour la compréhension de la mémoire. Premièrement, cette étude dissocie la mémoire des autres aspects intellectuels sur la base qu'ils n'utilisent pas les mêmes réseaux neuronaux. Deuxièmement, l'étude suggère que la mémoire à long-terme n'est pas une version longue durée de la mémoire à court-terme et, donc que les deux utilisent des structures neuronales différentes. Troisièmement, puisqu'en l'absence du lobe temporal il y a une mémoire rétrograde intacte malgré une amnésie antérograde, il est suggéré que le lobe temporal médian n'entrepose pas la mémoire mais qu'il joue un rôle critique pour enregistrer de nouvelles informations ainsi que pour transformer la mémoire à court terme en mémoire à long terme. Quatrièmement, l'ablation du lobe temporal médian n'abolit pas toute forme de mémoire à long terme puisque H.M. possède la capacité d'apprendre une tâche motrice complexe et d'en améliorer les performances (Milner, 1965; Milner et al., 1998). Cette forme de mémoire est aujourd'hui appelée mémoire implicite (ou non déclarative) puisqu'elle ne s'exprime pas en mots mais en efficacité d'exécution ou en performance motrice. Cette observation conduit donc à la conclusion que les différentes formes de mémoire à long terme utilisent différents réseaux neuronaux (Poldrack et Gabrieli, 1997).

2.1.1.1 DIFFÉRENTES FORMES DE MÉMOIRE

On dénote deux types de mémoire : implicite (aussi appelée non déclarative) ou explicite (nommée déclarative).

2.1.1.1.1 Mémoire implicite

La mémoire implicite est une forme de mémoire qui est rappelée de façon inconsciente (Roediger, 1990). La mémoire implicite est la mémoire de travail qui provient de l'entraînement et de la répétition d'une tâche, d'un événement ou d'un stimulus en particulier (Kandel et al., 2000). Elle s'exprime non pas en mots mais en performance, efficacité de la tâche effectuée ou en une diminution des erreurs (Squire, 1987). Elle se subdivise en quatre catégories (Figure 1).

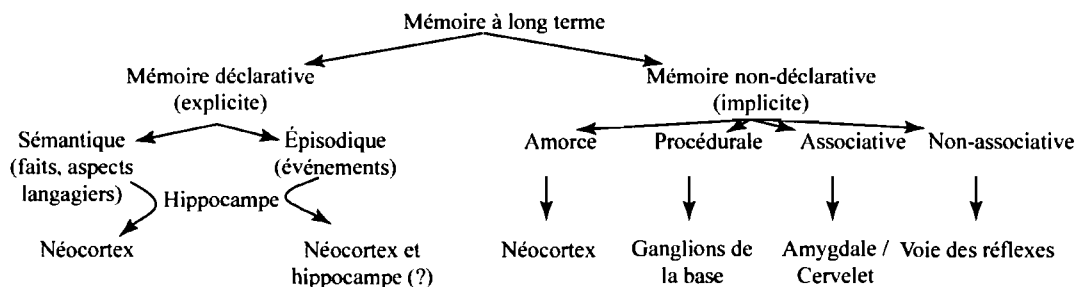


Figure 1. Systèmes de mémoire à long terme.

Les différentes formes de mémoire à long terme peuvent être de type déclarative ou non déclarative. Chaque forme de mémoire utilise des circuit neuronaux différents. Adapté de (Kandel et al., 2000).

Le conditionnement classique est une forme de mémoire implicite associative (Figure 1). Un exemple de mémoire associative est la réaction appétitive des chiens de Pavlov au son (conditionné) d'une cloche (Yerkes et Morgulis, 1909; Fanselow et Poulos, 2005). La mémoire implicite associative utilise les réseaux neuronaux de l'amygdale, du cervelet ou du tronc cérébral (Cahill et al., 1996; Fanselow et Poulos, 2005).

L'habituation est une forme de mémoire non associative (Figure 1). Par exemple, l'habituation à une forte odeur est la diminution de la réponse à un stimulus bénin.

Ces mécanismes mnésiques non associatifs utilisent les circuits neuronaux responsables des réflexes (Kandel et al., 2000).

La mémoire implicite procédurale est la mémoire des habiletés motrices (Figure 1). Par exemple, la capacité de faire du vélo sans réapprendre à chaque fois constitue une forme de mémoire procédurale. Ce type de mémoire serait localisé dans les réseaux neuronaux des ganglions de la base (Packard et al., 1989).

La mémoire implicite d'amorce permet le traitement rapide d'un stimulus suite à son exposition précédente (Figure 1). Elle permet la reconnaissance d'objets tel un visage familier. La mémoire d'amorce semble utiliser les mêmes réseaux neuronaux qui assurent le traitement perceptuel du stimulus (par ex. le système visuel) (Henson, 2003).

Les réseaux neuronaux qui supportent les différents types de mémoire implicite ne sont pas inclus dans le lobe temporal médian et donc sont demeurés généralement intacts dans le cas du patient H.M. (Corkin, 1968; Milner, 2005). Les déficits mnésiques de H.M. se limitent à la mémoire explicite.

2.1.1.1.2 Mémoire explicite

La mémoire explicite (ou déclarative) est soit épisodique ou sémantique (Figure 1). La mémoire épisodique est, comme son nom l'indique, la mémoire des événements significatifs de la vie et de leur chronologie (Squire, 1987). La mémoire sémantique est plus directement liée au langage et aux processus de signification langagière. C'est la mémoire de la définition des mots, des concepts et des conventions (Thompson et Kim, 1996; Kandel et al., 2000). Des études subséquentes sur H.M., d'autres patients et des modèles animaux montrent que la création de mémoire déclarative nécessite l'intégrité du lobe temporal médian et en particulier l'hippocampe (Scoville et Milner, 1957; Milner, 2005).

2.1.1.2 RÔLE PARTICULIER DE L'HIPPOCAMPE DANS LA MÉMOIRE

Une série d'études ont dirigé la recherche sur la mémoire vers une sous-région du lobe temporal, l'hippocampe. Par exemple, le patient P.B. a subi une lobectomie temporale en deux étapes. Ce n'est que lorsque l'hippocampe fut réséqué à la deuxième étape que les déficits mnésiques sont apparus (Penfield et Mathieson, 1974; Milner et al., 1998), suggérant que cette région est particulièrement critique pour la fonction mnésique.

L'équipe de David Amaral a étudié le patient R.B. qui avait développé une amnésie antérograde suite à un épisode d'ischémie dont les symptômes étaient très similaires à ceux observés chez H.M. (Zola-Morgan et al., 1986). L'analyse histologique réalisée après le décès du patient a démontré que l'épisode d'anoxie a provoqué une mort cellulaire limitée aux cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (Zola-Morgan et al., 1986) (voir aussi section 3 sur l'organisation de la structure de l'hippocampe). Contrairement à H.M., dont la lésion affectait l'hippocampe mais aussi l'amygdale et le cortex (Scoville et Milner, 1957; Milner, 2005), l'amnésie de R.B. et P.B. était causée par un trouble limité à une sous-région du lobe temporal, la formation hippocampique. Les déductions de Milner sur H.M. et la fonction du lobe temporal en général semblent donc s'appliquer aussi spécifiquement à l'hippocampe.

La compréhension de la base neuronale de la mémoire déclarative a été et reste un objectif principal de la recherche en neurosciences (Miller, 2005). À cette fin, on a longtemps utilisé les patients ayant des lésions au cerveau afin d'en tirer des conclusions sur la fonction de la région affectée. L'avantage de l'étude directe sur ces patients c'est que tous les types de mémoire peuvent être mesurés de façon simple et directe. La recherche chez l'humain a donc continué à tirer profit des cas particuliers, qui, pour plusieurs raisons, ont subi des pertes cellulaires importantes dans les régions plus ou moins spécifiques du lobe temporal médian. Mais cette approche possède aussi ses restrictions : il est effectivement très rare qu'un patient

ait une lésion limitée à une région spécifique. Même les conclusions sur le cas de H.M. ne peuvent s'appliquer à l'hippocampe uniquement puisqu'une série de structures périphériques (amygdale, cortex entorhinal, etc.) ont aussi été lésées (Scoville et Milner, 1957) et, donc, le rôle particulier de chacune ne peut être clairement identifié. C'est pourquoi, malgré un grand nombre de découvertes majeures provenant de la neuropsychologie des patients lésés, la recherche s'est tournée vers des modèles expérimentaux afin de répondre à des questions plus spécifiques.

L'approche expérimentale a tout d'abord démontré que chez le singe et les rongeurs, des lésions identiques à celle du patient H.M. reproduisaient une amnésie de la mémoire spatiale (Squire et Zola-Morgan, 1991). Des ablations localisées à l'hippocampe ont ensuite confirmé qu'elles étaient suffisantes pour induire des déficits de mémoire (Zola-Morgan et al., 1986; Zola-Morgan et al., 1992) alors que l'ablation seule de l'amygdale n'a pas d'effet sur la mémoire explicite (Squire et Zola-Morgan, 1991). Ceci suggère donc que dans le lobe temporal, le rôle particulier de l'hippocampe est crucial pour la mémoire explicite. Par contre, il n'est pas exclu que les régions périphériques à l'hippocampe dans le lobe temporal (cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique) jouent aussi un rôle très important puisque leur ablation avec l'hippocampe augmente les déficits mnésiques. En effet, il semble y avoir une gradation proportionnelle entre l'étendue des dommages entourant l'hippocampe et la sévérité des déficits mnésiques autant chez les rongeurs (Morris et al., 1990; Zola-Morgan et al., 1994; Rempel-Clower et al., 1996), chez les singes (Zola-Morgan et al., 1994) que chez l'humain (Rempel-Clower et al., 1996). Cette gradation semble même avoir lieu en fonction de l'étendue des dommages à l'intérieur de l'hippocampe (Moser et al., 1993; Moser et al., 1995). Ces observations confirment aussi l'hypothèse initiale que les pertes de mémoire grave auraient surtout lieu dans les cas où la résection du lobe temporal est si étendue qu'elle englobe une portion majeure de l'hippocampe (Scoville et Milner, 1957).

Le rôle particulier de l'hippocampe dans la mémoire déclarative est aussi confirmé par les études d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, qui montrent une activation spécifique de cette région lors d'un effort de mémorisation (Henson et al., 1999).

En 1971, O'Keefe découvre que les cellules principales de l'hippocampe encodent la position relative dans l'espace sous la forme de patrons d'activité (O'Keefe et Dostrovsky, 1971). Cette observation suggère que l'hippocampe joue aussi un rôle essentiel pour la mémoire spatiale, une forme de mémoire déclarative concernée par la localisation spatiale.

L'ensemble de ces études expérimentales a permis, non seulement de confirmer les observations suggérant que le lobe temporal médian joue un rôle essentiel dans la mémoire chez l'humain, mais aussi de mener à l'identification plus fine des sous-structures importantes pour cette fonction. Finalement, ces études expérimentales montrent le rôle essentiel de l'hippocampe (en soulignant l'importance des structures avoisinantes, tels les cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique) dans la mémoire déclarative et spatiale (Squire, 1992).

2.1.2 LES THÉORIES SUR LA CONSOLIDATION DE LA MÉMOIRE DANS LE NEOCORTEX.

Est-ce que le rôle de l'hippocampe dans la mémoire est de courte durée (se limitant à l'acquisition de la mémoire) ou est-ce qu'il joue un rôle aussi dans le maintien et le rappel des souvenirs ? Le modèle "classique" de la consolidation de la mémoire dans le néocortex suggère que l'information transite par l'hippocampe pendant son acquisition et sa consolidation est ensuite transférée vers les structures corticales (Squire et Alvarez, 1995). Une évidence expérimentale de cette théorie est l'observation que l'activité métabolique élevée de l'hippocampe diminue, lors d'un exercice de rétention de mémoire, en fonction de la durée de la rétention (Bontempi et al., 1999). L'aspect temporel de cette fonction hippocampique est

très important (Alvarez et Squire, 1994). L'entreposage de la mémoire dans le néocortex est un phénomène lent. C'est donc le processus de consolidation de la mémoire dans l'hippocampe qui permet un transfert entre l'instantanéité de l'information sensorielle et la stabilité de la trace mnésique corticale de l'événement (Squire et Alvarez, 1995). L'hippocampe permet donc ici d'acquérir l'information de façon temporaire pendant que l'information est consolidée dans le néocortex (Figure 2).

Selon cette théorie, les différentes modalités d'une information (couleur, odeur, bruit, goût, sensation tactile, etc.) sont encodées dans leurs régions respectives (et donc distinctes) du cortex sensoriel (Squire et Alvarez 1995). Pour former un souvenir, l'hippocampe jouerait initialement un rôle intégrateur en formant un schéma mnésique connectant temporairement les sites d'entreposage corticaux de chacune des modalités qui composent ensemble un souvenir global (Alvarez et Squire, 1994; McClelland et al., 1995) (Figure 2). Ensuite, lorsqu'un temps suffisant est alloué, l'hippocampe n'est plus nécessaire pour maintenir la mémoire déclarative à long terme car celle-ci réside et dépend uniquement du néocortex (Squire et Alvarez, 1995).

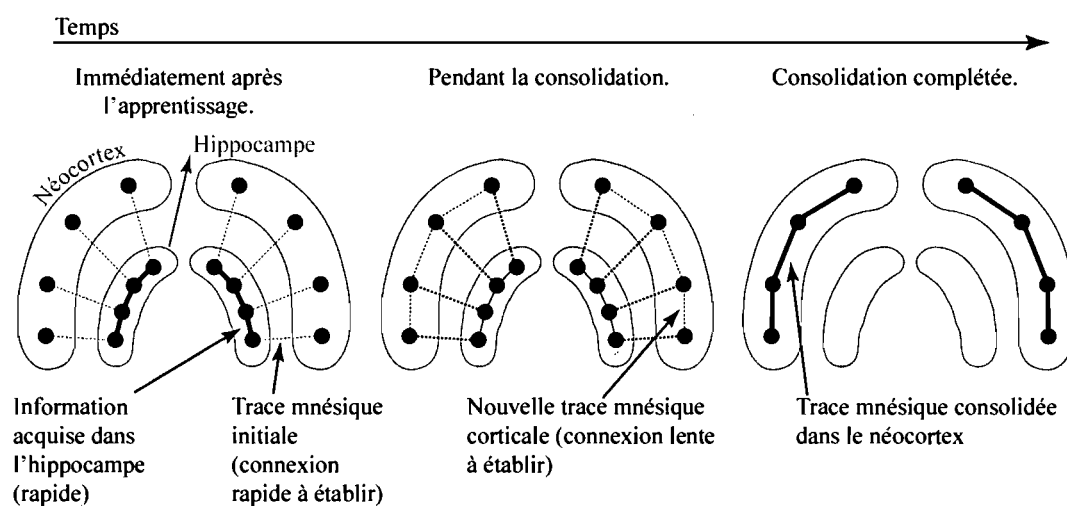


Figure 2. Théorie classique de la consolidation de la mémoire dans le néocortex.

Immédiatement après l'acquisition de nouvelles données, les connexions établies entre différentes aires néocorticales sont faibles et dépendent

complètement des connexions formées rapidement dans et avec l'hippocampe (gauche). Avec le temps, le signal de consolidation qui émane de l'hippocampe, solidifie les connexions entre les aires du néocortex (centre) jusqu'au point où l'activité de l'hippocampe n'est plus nécessaire (droite). Cette consolidation peut s'étendre sur de longues périodes (semaines, mois ou plus). Adapté de (Alvarez et Squire, 1994; Andersen, 2007).

Le passage de mémoire dépendante de l'hippocampe à indépendante de l'hippocampe expliquerait qu'une lésion de l'hippocampe crée aussi une amnésie rétrograde de plus ou moins longue durée (comme c'est le cas chez H.M.) (Squire et Zola-Morgan, 1991). En fait, des études ont montré que l'amnésie rétrograde est gradée proportionnellement à l'ampleur de la lésion (Morris et al., 1990; Moser et al., 1993; Zola-Morgan et al., 1994; Moser et al., 1995; Rempel-Clower et al., 1996). Ainsi, les mémoires qui étaient en cours de consolidation, et donc non fixées dans le cortex au moment de la lésion, sont perdues (Squire et Alvarez, 1995; Milner et al., 1998). Selon ce modèle, l'hippocampe n'est pas nécessaire pour le rappel de la mémoire et c'est ce qui explique comment des patients comme H.M. se rappellent de leur enfance (Squire et Alvarez, 1995).

Des données plus récentes ont remis en question ce modèle "classique" de mémoire et proposent le modèle des "traces mnésiques multiples" ou la mémoire est entreposée à la fois dans les structures hippocampiques et extra-hippocampiques. L'observation que le rappel de mémoires réactive à la fois des aires corticales et l'hippocampe (Nadel et al., 2000; Ryan et al., 2001; Maguire et Frith, 2003) suggère que celui-ci a un rôle permanent dans l'entreposage et le rappel de l'information épisodique et spatiale (Nadel et al., 2000). Effectivement, les études d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle démontrent que l'hippocampe est activé dans le processus conscient de remémoration des souvenirs de mémoire épisodique et spatiale chez un sujet sain (Eldridge et al., 2000). Lorsque l'hippocampe est lésé ou absent, la remémoration ne rapporterait pas l'information complète du souvenir initial mais un souvenir qualitativement

différent (Nadel et al., 2000). Dans le modèle des traces mnésiques multiples, les informations sémantiques sont traitées différemment et résident totalement dans le cortex après leur consolidation. L'information sémantique consolidée dans le néocortex peut donc survivre à une lésion de l'hippocampe.

Le choix de l'hippocampe comme cadre expérimental de cette thèse est donc motivé par l'importance de cette structure dans les fonctions mnésiques. Avant d'aborder les mécanismes cellulaires qui soutiennent ces fonctions mnésiques, il est important de décrire l'organisation cellulaire particulière de l'hippocampe.

2.2 ORGANISATION DE LA FORMATION HIPPOCAMPIQUE.

Cette section passe en revue les connaissances actuelles de l'organisation fonctionnelle de l'hippocampe.

L'hippocampe est souvent appelé "corne d'Ammon" en référence à sa forme similaire à la corne d'un bélier (le symbole du dieu égyptien Ammon). On utilise les initiales de cette nomenclature pour définir les régions de l'hippocampe CA3, CA2 et CA1 (Lorente de Nó, 1934). À l'hippocampe, s'ajoutent, pour compléter la formation hippocampique, le gyrus dentelé, le subiculum, le présubiculum, le parasubiculum et le cortex entorhinal (Amaral et Witter, 1989; Andersen, 2007).

L'hippocampe est une structure du lobe temporal (Amaral et Witter, 1989) et s'étend sur un axe septo-temporal. Une coupe transversale de l'hippocampe (Figure 3) montre une structure de couches particulièrement organisée (Lorente de Nó, 1934; Lopes da Silva et al., 1990) dont le contenu homogène de chacune des couches fait en sorte qu'elles sont facilement différenciables. Ainsi, dans le gyrus dentelé, on distingue la couche la plus superficielle : la *stratum moleculare* ou couche moléculaire (Amaral et Witter, 1989). Cette couche est parfois subdivisée en trois parties selon la stratification différentielle des afférences que chacune

d'elles reçoit (voie perforante latérale, voie perforante médiane et voie commissurale associative) (Amaral et Witter, 1989). Plus profonde, la strate plus claire des cellules granulaires a une forme en "V" évidente. Vient ensuite le *hilus*, ou couche polymorphique. Dans les régions CA3, CA2 et CA1 on distingue, de la surface vers la fissure hippocampique, la couche *alveus*, la couche *oriens*, la couche des cellules pyramidales, la couche *radiatum*, la couche *lacunosum moleculare* et, finalement, la fissure hippocampique (Figure 3) (Amaral et Witter, 1989). On distingue aussi parfois la couche *stratum lucidum* adjacente à la couche des cellules pyramidales du CA3 et contenant les fibres moussues (Freund et Buzsaki, 1996; Andersen, 2007).

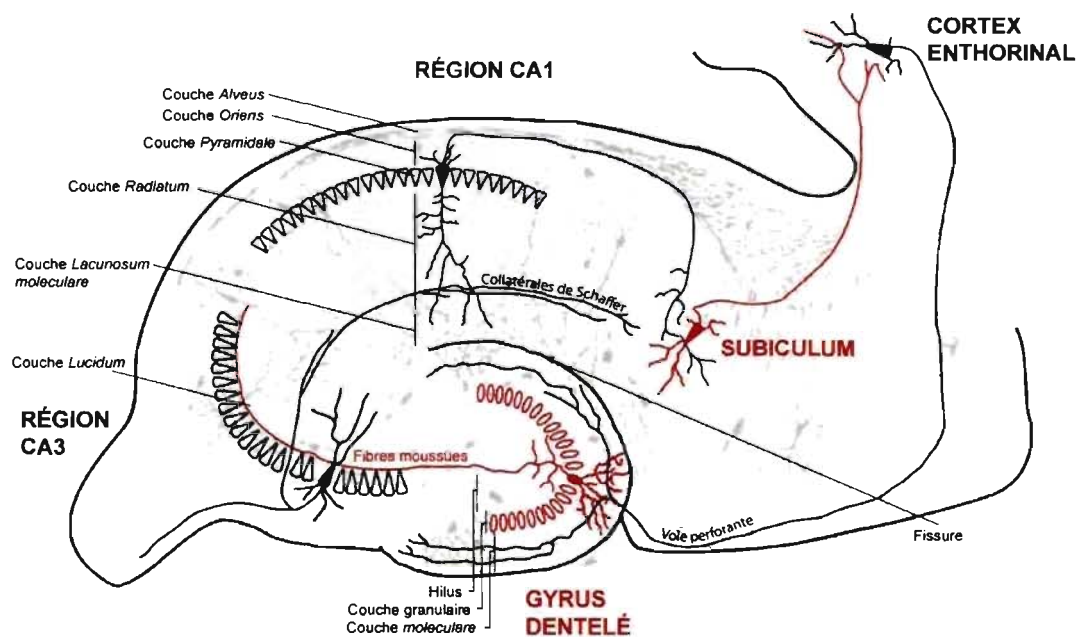


Figure 3. Organisation de la formation hippocampique.

Schéma de l'organisation cellulaire de la formation hippocampique en coupe transversale. Le schéma montre 5 types de cellules principales ainsi que leurs axones. Les cellules granulaires du gyrus dentelé et les fibres moussues (rouge en bas). Les cellules pyramidales de la région CA3 et les collatérales de Schaffer (noir à gauche). Les cellules pyramidales de la région CA1 et les projections vers le subiculum (bleu). Les cellules pyramidales du subiculum et les projections vers le cortex entorhinal (rouge en haut). Les cellules du cortex entorhinal et la voie perforante (noir à droite). Les différentes couches du gyrus dentelé et de l'hippocampe sont indiquées. Schéma adapté d'une illustration de Ramon y Cajal (Ramón y Cajal, 1893).

Une des particularités de l'hippocampe est que certaines de ses connexions sont principalement unidirectionnelles (Andersen et al., 1969). En effet, dans la plupart des régions du cortex, une connexion de la région A vers la région B possède aussi une réciproque de B vers A. Les cellules principales du gyrus dentelé ont des axones appelés les fibres moussues qui contactent les cellules pyramidales de la région CA3. Ces fibres moussues sont unidirectionnelles et forment le seul contact synaptique entre les cellules granulaires du gyrus dentelé et les cellules pyramidales de la région CA3 (Blackstad et al., 1970; Amaral et Dent, 1981). À leur tour, les cellules pyramidales de la région CA3 forment des axones, les collatérales de Schaffer, qui représentent l'input majeur de la région CA1 (Lopes da Silva et al., 1990). On met souvent l'emphase sur les trois premières connexions hippocampiques que l'on nomme "circuit trisynaptique" (cortex entorhinal vers gyrus dentelé, gyrus dentelé vers CA3 et CA3 vers CA1) (Naber et al., 2000). Or, cette appellation réductrice date des premières découvertes électrophysiologiques et anatomiques où ces connexions furent mises en évidence (Naber et al., 2000). Nous savons aujourd'hui qu'il y a des projections majeures de la région CA1 vers le subiculum et le cortex entorhinal mais aussi du cortex entorhinal vers la région CA1 (Naber et al., 2000) qui ferment la boucle de l'hippocampe et que le cortex entorhinal est la source principale des efférences vers le néocortex (Amaral et Witter, 1989; Andersen, 2007). Le circuit trisynaptique est donc considéré aujourd'hui comme une portion du circuit fonctionnel de la formation hippocampique.

2.2.1 CELLULES PRINCIPALES ET SYSTÈMES DE FIBRES

Sur la base de différents critères (taille des cellules pyramidales, marqueurs neurochimiques et afférences), l'hippocampe n'est généralement subdivisé qu'en deux régions distinctes : CA3 et CA1. Les descriptions initiales de Rafael Lorente de Nó et Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1934) font cependant état de la région CA4 et CA2. La région CA4 serait formée d'une

petite population dont les corps cellulaires sont situés entre le *hile* et le gyrus dentelé (Amaral et Witter, 1989; Andersen, 2007). La région CA2 serait formée d'une petite population de grosses cellules pyramidales comme dans la région CA3 mais qui, contrairement à celle-ci, ne sont pas contactées par les fibres moussues (Amaral et Witter, 1989; Andersen, 2007). Pour leur différenciation controversée, la taille réduite de leurs populations cellulaires, la quasi absence d'information sur leurs afférences et leurs projections ainsi que pour leur apport fonctionnel peu connu, nous ne considérerons pas dans cette thèse les régions CA4 et CA2 de l'hippocampe. Par définition, les cellules principales sont les neurones de projection dont l'axone est dirigé vers une autre région de l'hippocampe. Les cellules principales des régions de la formation hippocampique sont donc les cellules granulaires du gyrus dentelé, les cellules pyramidales de la région CA3, les cellules pyramidales de la région CA1, les cellules pyramidales du subiculum et les neurones du cortex entorhinal.

2.2.1.1 GYRUS DENTELÉ ET FIBRES MOUSSUES

Le gyrus dentelé est une région trilaminée avec une forme caractéristique en "V" (Figure 3). La branche suprapyramidale s'étend entre la couche CA3 et la fissure. La branche infrapramidale s'étire au delà de la couche pyramidale de la région CA3. La couche moléculaire, en surface, contient l'arborisation dendritique des cellules granulaires qui s'étend de façon conique vers la surface du gyrus dentelé (Lopes da Silva et al., 1990). Ensuite, il y a la couche compacte des corps cellulaires des cellules granulaires, qui sont densément apposés (Lopes da Silva et al., 1990). Finalement, la couche des cellules polymorphiques contient les axones de cellules granulaires. Le gyrus dentelé est l'une des rares régions où la neurogénèse est post-natale et se continue chez l'adulte (Kempermann et al., 1997, 1998). Le gyrus dentelé contient aussi d'autres types de cellules. Les cellules *mossy* sont des neurones dont l'axone innerve le gyrus dentelé de l'hémisphère cérébrale controlatérale (Ribak et al., 1985) et des interneurones.

L'axone des cellules granulaires forme les fibres moussues qui représentent le contact unidirectionnel principal et unique entre les cellules granulaires du gyrus dentelé et les cellules pyramidales de la région CA3 (Blackstad et al., 1970) (Figure 3). Ces axones possèdent des boutons mousseux (à l'origine de leur nom) qui forment des "synapses en passant" sur les dendrites des cellules pyramidales de la région CA3 (Gaarskjaer, 1978a, b). Les fibres moussues sont organisées de façon très particulière : les axones des cellules granulaires de la branche suprapyramidale contactent les cellules pyramidales de la région CA3 distante (Lopes da Silva et al., 1990); quant aux axones des cellules granulaires de la branche infrapyramidale, ils contactent les cellules pyramidales de la région CA3 proximale (Lopes da Silva et al., 1990).

2.2.1.2 CA3 ET COLLATÉRALES DE SCHAFFER

Les cellules pyramidales de la région CA3 ont des dendrites apicales qui s'étendent dans les couches *radiatum* et *lacunosum moleculare* et atteignent la fissure hippocampique (Figure 3). Ces cellules pyramidales ont aussi des dendrites basales nombreuses dans la couche *oriens*. L'arbre dendritique est densément couvert d'épines. La partie proximale des dendrites apicaux forme des synapses avec les fibres moussues dans la couche *lucidum* (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1934). Les synapses avec les fibres moussues sont rares sur les dendrites basales (Amaral et Dent, 1981). Les cellules pyramidales de la région CA3 reçoivent aussi des afférences des voies commissurales et associatives d'autres cellules pyramidales de la région CA3 ainsi que des projections directes du cortex entorhinal (Amaral et Witter, 1989; Lopes da Silva et al., 1990).

L'axone des cellules pyramidales de la région CA3 émerge de la partie basale du corps cellulaire, s'arborise dans la région CA3 et projète dans la région CA1 (Figure 3). Un seul axone d'une cellule pyramidale de la région CA3 peut s'étendre sur les deux tiers de l'axe septo-temporal de l'hippocampe et former de 20000 à 60000 terminaisons (Li et al., 1994). Les collatérales de Schaffer ont une

organisation très particulière. Les collatérales de Schaffer originaires des pyramidales de la région CA3 distale projettent majoritairement dans la couche *oriens* (très peu dans la couche *radiatum*) de la région CA1 proximale (Ishizuka et al., 1990). Les collatérales de Schaffer originaires des pyramidales du CA3 proximal projettent dans la couche *stratum radiatum* de la région CA1 distale (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). En fonction de la position (proximale ou distale) dans le CA1, l'input du CA3 ne provient donc pas des mêmes cellules pyramidales ni de la même région du CA3 (Ishizuka et al., 1990). Les cellules pyramidales du CA3 contactent aussi l'hippocampe contralatéral par la voie commissurale.

2.2.1.3 CA1 ET CONNEXIONS AVEC LE SUBICULUM

Les cellules pyramidales de la région CA1 possèdent une dendrite apical principal qui s'arborise dans les couches *radiatum* et *lacunosum moleculare* avant d'atteindre la fissure (Figure 3). Les dendrites basales s'arborisent dans la couche *oriens* et atteignent la couche *alveus* (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1934; Amaral et Witter, 1989; Amaral et al., 1991; Andersen, 2007). L'arbre dendritique des cellules pyramidales de la région CA1 est couvert d'épines dendritiques (Harris et Landis, 1986; Andersen, 1990). L'axone émerge de la zone basale du corps cellulaire et pénètre l'*alveus*. Contrairement à la région CA3, il y a peu de projections locales et associatives des cellules pyramidales de la région CA1 (Lorente de Nó, 1934; Amaral et Witter, 1989; Amaral et al., 1991; Radpour et Thomson, 1992). Les axones de cellules pyramidales de la région CA1 traversent plutôt dans la couche *oriens* et connectent le subiculum et le cortex entorhinal (Amaral et al., 1991). Il s'agit donc de la porte de sortie de l'hippocampe (Figure 3).

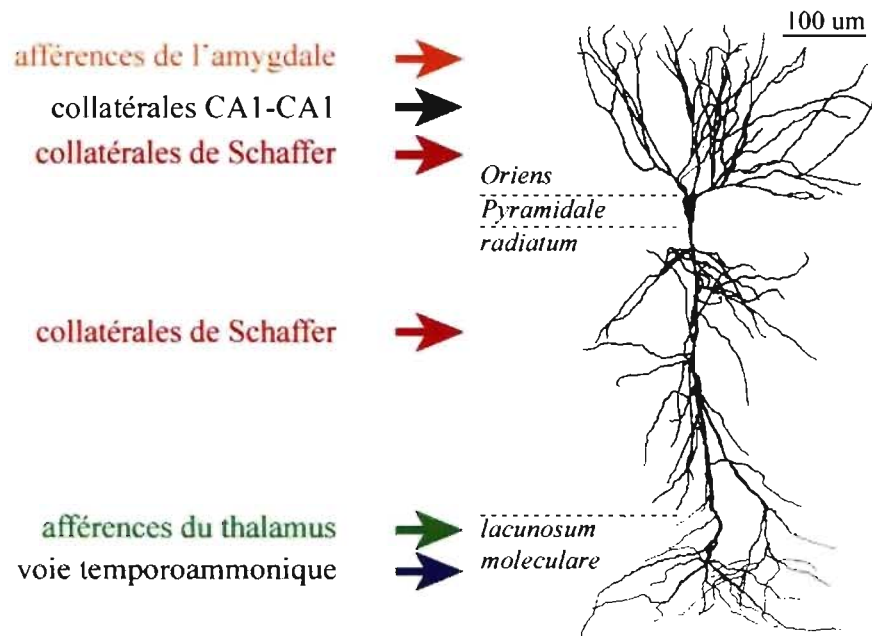


Figure 4. Cellule pyramidale de la région CA1 et distribution des afférences glutamatergiques.

Les pyramidales de la région CA1 possèdent 5 afférences glutamatergiques connues. Adapté de (Andersen, 2007) :

- 1- Les collatérales de Schaffer (Figure 4, rouge) provenant de la région CA3 (Ishizuka et al., 1990).
- 2- Les neurones du cortex entorhinal innervent la couche *stratum lacunosum moleculare* (Figure 4, bleu) et contactent aussi des interneurons par la voie temporoammonique (Amaral et Witter, 1989; Naber et al., 2001).
- 3- Le thalamus innerve aussi la couche *stratum lacunosum moleculare* (Figure 4, vert) (Dolleman-Van der Weel et Witter, 2000).
- 4- Les pyramidales de la région CA1 forment des collatérales qui innervent faiblement d'autres pyramidales dans la couche *oriens* (Figure 4, noir).
- 5- L'amygdale contacte aussi les pyramidales de la région CA1 dans la couche *oriens* (Figure 4, orange) (Pikkarainen et al., 1999).

Chaque couche de la région CA1 possède donc plusieurs afférences distinctes, mais la contribution particulière de chacune de ces afférences n'est pas équivalente (Amaral et Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990). Ainsi, la couche *stratum radiatum* possède majoritairement des axones provenant de la région CA3 mais aussi des collatérales du cortex entorhinal (Amaral et Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990; Andersen, 2007). Il est probable que les afférences mineures ne sont pas

distribuées uniformément sur les cibles potentielles mais plutôt ségréguées sur certains types cellulaires (Amaral et Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990).

2.2.1.4 SUBICULUM, PRÉSUBICULUM ET PARASUBICULUM

Le subiculum, présubiculum et parasubiculum sont souvent regroupés en un seul complexe subiculaire (Figure 3). La limite entre la région CA1 et le subiculum est caractérisée par la fin des collatérales de Schaffer (Amaral et al., 1991; Naber et al., 2000; Naber et al., 2001) ainsi que par l'endroit où la couche condensée des cellules pyramidales de la région CA1 commence à s'élargir (Amaral et Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990; Andersen, 2007).

Les cellules pyramidales du complexe subiculaire reçoivent une partie des projections des cellules pyramidales de la région CA1 (Amaral et al., 1991) et contactent, par leurs axones, le cortex entorhinal (Caballero-Bleda et Witter, 1993, 1994).

2.2.1.5 CORTEX ENTORHINAL, VOIES PERFORANTE, TEMPOROAMMONIQUE ET PROJECTIONS VERS LE CA3

Les neurones du cortex entorhinal contactent le reste de la formation hippocampique par trois voies :

La voie perforante (Figure 3) connecte le cortex entorhinal au gyrus dentelé (Dolorfo et Amaral, 1998a, b). Il s'agit d'une des portes d'entrée de l'hippocampe puisque le cortex entorhinal reçoit l'information des aires corticales supérieures (Dolorfo et Amaral, 1998a, b). La voie perforante utilise le faisceau angulaire par lequel passent les axones des neurones du cortex entorhinal (majoritairement des couches II et III et, en moindre mesure, des couches V et VI) (Steward et Scoville, 1976) et connectent l'arbre dendritique des cellules granulaires du gyrus dentelé (Dolorfo et Amaral, 1998a).

Une deuxième voie de connexion est la voie temporoammonique. Les axones de cette voie proviennent aussi des neurones du cortex entorhinal mais dirigent leurs axones vers la région CA1 de l'hippocampe (Witter et al., 1988; Naber et al., 2001). Ces axones empruntent le faisceau angulaire, traversent le subiculum, longent la fissure et se terminent dans la couche *lacunosum moleculare* (Naber et al., 2001).

Finalement, un autre sous-ensemble de collatérales provenant des cellules du cortex entorhinal connectent les pyramidales de la région CA3 (Tamamaki et Nojyo, 1993).

Il est intéressant de noter que le cortex entorhinal est la "porte d'entrée" de l'information corticale vers l'hippocampe mais aussi la sortie principale de ce circuit. Le cortex entorhinal reçoit des projections directes des cellules pyramidales de la région CA1 et du subiculum (Amaral et Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990; Andersen, 2007).

2.2.1.6 CONNECTIVITÉ DE L'HIPPOCAMPE ET TRANSFERT D'INFORMATION

Les caractéristiques principales qui se dégagent de l'étude des connexions hippocampiques sont les suivantes :

1- La connectivité est en partie unidirectionnelle.

Comme mentionné précédemment, plusieurs étapes de la connectivité hippocampique (gyrus dentelé vers la région CA3; région CA3 vers région CA1) sont unidirectionnelles (Amaral et Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990).

2- La divergence de la connectivité hippocampique.

Une seule cellule granulaire fait synapse sur plusieurs cellules pyramidales du CA3 qui, à leur tour, envoient leur axone vers plusieurs cellules pyramidales de la région CA1 (Amaral et Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990; Andersen, 2007). Malgré cette connectivité divergente, les liens entre deux régions ne sont pas étendus de façon uniforme (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). Toutes les pyramidales de la région CA3 ne possèdent pas la même probabilité de faire synapse sur une cellule pyramidale donnée dans la région CA1. Comme mentionné précédemment, les cellules pyramidales de la région CA3 proximale émettent des axones vers la région CA1 distale et vice-versa (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). La ségrégation des connexions entre la région CA1 et le subiculum est aussi frappante et possède le même patron de connexions (CA1 proximal- subiculum distal vice-versa) (Amaral et al., 1991; Naber et al., 2000; Naber et al., 2001). Finalement, les projections de la voie temporoammonique ainsi que celles entre le subiculum et le cortex entorhinal possèdent également une régionalisation des projections (Witter et al., 1988; Dolorfo et Amaral, 1998b; Naber et al., 2001). Malgré la divergence des connexions, la distribution hautement organisée des projections axonales évoque la possibilité que le traitement d'information dans l'hippocampe ne recrute pas toute l'étendue du réseau mais plutôt des sous-circuits réduits et isolés, autrement dit, des "canaux" relativement indépendants (Andersen, 2007) (Figure 5).

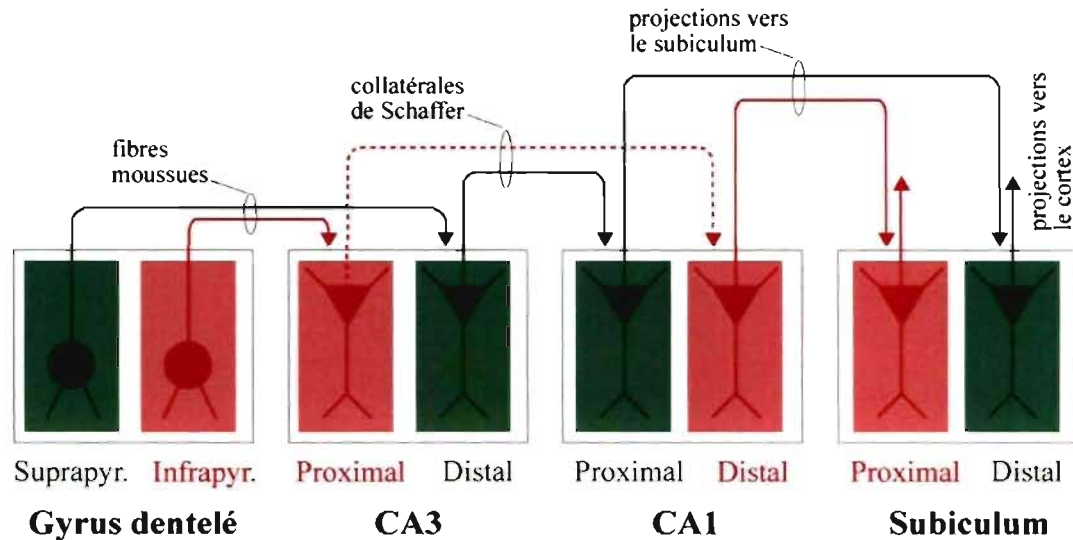


Figure 5. Traitement de l'information en canaux indépendants.

Résumé schématique des connexions synaptiques principales de la formation hippocampique. Cette représentation suggère que le transfert d'information dans l'hippocampe est ségrégué dans des canaux indépendants identifiés ici en rouge et en vert. Adapté de (Andersen, 2007).

3- Le traitement sériel et parallèle de l'information.

On met souvent l'emphase sur les connexions unidirectionnelles de l'hippocampe et, donc, sur le traitement sériel d'information. Cependant, il est important de noter la présence de projections parallèles dans le circuit hippocampique (Figure 6). Par exemple, les neurones du cortex entorhinal projettent à la fois vers le gyrus dentelé, la région CA3 et la région CA1 de l'hippocampe (Witter et al., 1988; Dolorfo et Amaral, 1998a; Naber et al., 2001). Ceci suggère que l'information transmise par un groupe de cellules du cortex entorhinal peut arriver aux pyramidales de la région CA1 à la fois par voie polysynaptique (traitement sériel : voie perforante, fibres moussues et collatérales de Schaffer) et par voie monosynaptique (traitement parallèle : voie temporoammonique) (Figure 6).

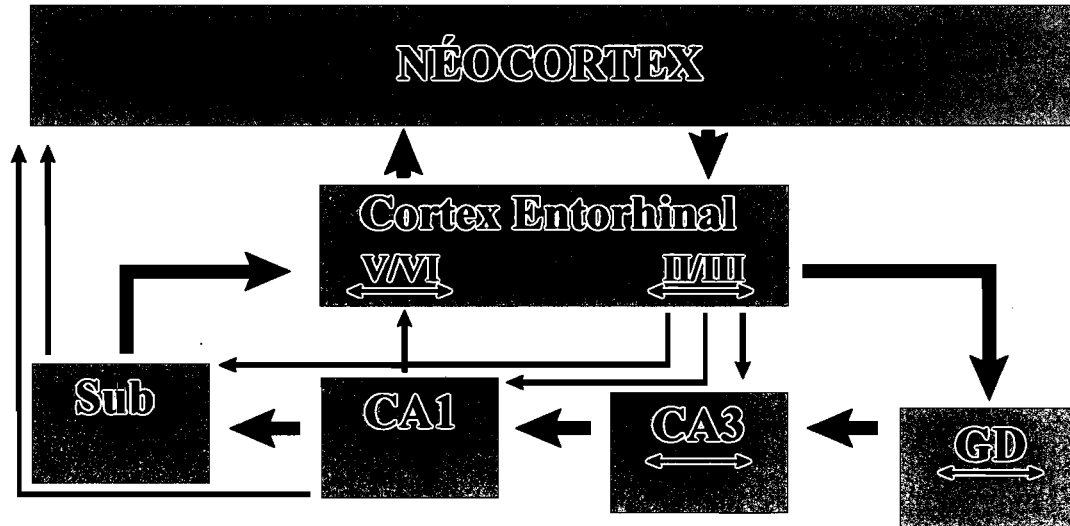


Figure 6. Connexions sérielles et parallèles dans l'hippocampe.

Résumé schématique des connexions dans l'hippocampe. Malgré un circuit principal largement sériel (flèches larges), l'hippocampe contient aussi des connexions parallèles (flèches étroites). Adapté de (Andersen, 2007).

2.2.1.7 CONNEXIONS SOUS-CORTICALES

Une des propriétés caractéristiques de la connectivité du circuit dans l'hippocampe est que la majorité des connexions synaptiques proviennent de connexions intrinsèques à l'hippocampe. L'hippocampe possède aussi des connexions dont l'origine est extrinsèque à l'hippocampe. Les commissures ventrales et dorsales contiennent majoritairement des fibres qui relient l'hippocampe d'un hémisphère cérébral avec des régions homotypiques et hétérotypiques de l'hippocampe de l'hémisphère controlatéral (Raisman et al., 1966; Amaral et al., 1984). La couche *alveus* de l'hippocampe est formée d'un système de fibres myélinisées qui contiennent à la fois des fibres afférentes provenant du noyau septal, du *locus coeruleus* et du noyau du raphé) et des fibres efférentes (les projections du CA1 vers le septum, le thalamus et les noyaux mamillaires) (Wyss et al., 1980). La connexion majeure entre l'hippocampe et le néocortex passe par le cortex entorhinal (Andersen, 2007). Les projections de l'amygdale vers l'hippocampe se terminent, en partie, dans la couche *radiatum* de la région CA1 (Pikkarainen et al., 1999). L'hippocampe est également innervé par des afférences sérotonergiques qui

proviennent des noyaux du raphé dans le tronc cérébral (Lopes da Silva et al., 1990; Freund et Buzsaki, 1996; Gulyas et al., 1999). L'hippocampe constitue aussi une des cibles des projections du septum médian qui pénètrent dans l'hippocampe principalement par la voie fimbria-fornix (Lopes da Silva et al., 1990; Freund et Buzsaki, 1996; Gulyas et al., 1999). Les afférences noradrénergiques de l'hippocampe proviennent du *locus coeruleus* et parviennent à l'hippocampe en empruntant la voie fimbria-fornix, le *fasciculus cinguli* ou la voie amygdaloïde (Mongeau et al., 1997). L'hippocampe reçoit des projections du noyau *reuniens* dans le thalamus qui sont distribuées dans la couche *lacunosum moleculare* de la région CA1 (Bokor et al., 2002).

L'organisation des cellules principales de l'hippocampe forme donc un circuit principal qui achemine l'information d'une région de l'hippocampe à l'autre. Cependant, l'information ne fait pas que transiter par l'hippocampe, elle y est aussi traitée, modulée et bonifiée. C'est pour ces fonctions qu'entrent en jeu les interneurons de l'hippocampe. En effet, les interneurons inhibiteurs de l'hippocampe jouent un rôle crucial pour façonner l'activité des neurones de projection de l'hippocampe.

2.2.2 RÉSEAU INHIBITEUR DE L'HIPPOCAMPE

En plus des cellules de projection excitatrices, des interneurons inhibiteurs sont aussi présents dans l'hippocampe. Les interneurons furent nommés ainsi par Santiago Ramón y Cajal et Rafael Lorente de Nó (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1934) car leur axone est généralement circonscrit dans une région de l'hippocampe et ne projette pas à l'extérieur de la région d'origine. Une caractéristique commune à tous les interneurons est qu'ils utilisent le GABA, un neurotransmetteur inhibiteur, et, donc, qu'ils peuvent être identifiés par l'enzyme de synthèse de ce neurotransmetteur, la décarboxylase de l'acide glutamique (Freund et Buzsaki, 1996). Contrairement à l'uniformité relative des cellules principales (granulaires et pyramidales), les interneurons forment une classe de

neurones extrêmement diversifiés en termes de morphologie, physiologie, connexions et expression de protéines (Freund et Buzsaki, 1996; Maccaferri et Lacaille, 2003).

2.2.2.1 CARACTÉRISTIQUES DENDRITIQUES DES INTERNEURONES

Une particularité qui différencie les interneurones des cellules principales de la région CA1 de l'hippocampe est l'absence (à quelques exceptions près) d'épines sur leur arbre dendritique (Freund et Buzsaki, 1996). Or, les épines dendritiques sont un compartiment essentiel à la spécificité synaptique et à la formation de microdomaines calciques (Yuste et Denk, 1995). Il est possible que l'absence d'épines sur les interneurones influence leur capacité à intégrer ou à discriminer des signaux (Freund et Buzsaki, 1996; Andersen, 2007). Lorsque ces épines sont présentes sur les interneurones, elles sont dépourvues de l'appareil normalement retrouvé dans les épines pyramidales et possèdent de nombreuses synapses, suggérant qu'en fait, les épines des interneurones servent à augmenter la superficie membranaire (McBain et al., 1999). Malgré l'absence d'épines, il a été démontré que les synapses sur les dendrites d'interneurones sont tout de même compartimentalisées grâce à la formation de microdomaines restreints dont la signalisation calcique est gérée par des récepteurs AMPA perméables au calcium (Goldberg et al., 2003).

2.2.2.2 DIVERSITÉ DES INTERNEURONES DE L'HIPPOCAMPE

Les interneurones de l'hippocampe sont classifiés selon plusieurs critères. La caractérisation morphologique des interneurones est généralement basée sur la localisation du corps cellulaire, de l'arbre dendritique et des projections axonales. Certaines informations fonctionnelles peuvent être tirées de l'analyse morphologique d'un interneurone. Déjà Ramón y Cajal et Lorente de Nó (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1934) avaient suggéré que la distribution dendritique laminaire prédisait la nature des afférences d'une cellule tandis que l'arborisation axonale indiquait les cibles éventuellement contactées. Par exemple, un interneurone dont les dendrites sont dans la couche *radiatum* de la région CA1

reçoit probablement comme afférences les collatérales de Schaffer (Figure 7 et Figure 8) puisqu'il s'agit des principales afférences de cette région (Gulyas et al., 1999; Pouille et Scanziani, 2001).

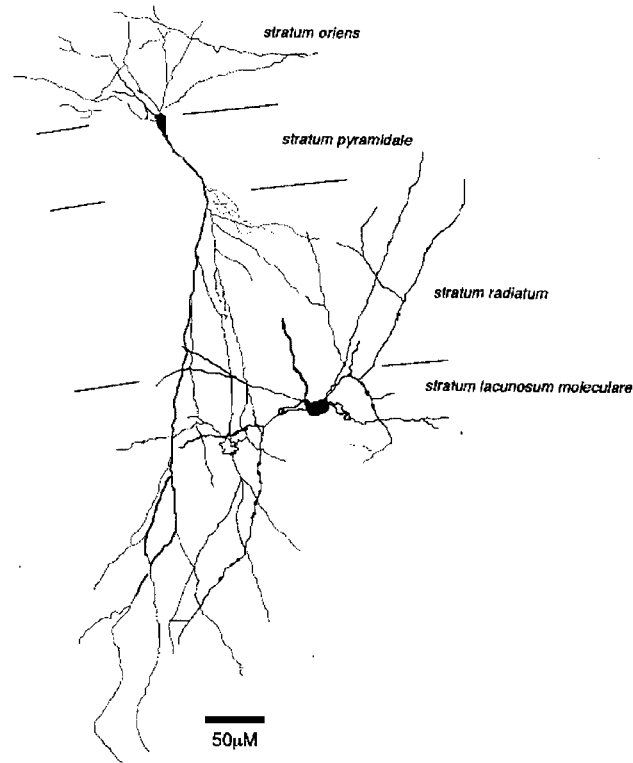


Figure 7. Distribution dendritique et axonale d'un interneurone de la couche *lacunosum moleculare*.

Cellule pyramidale (vert). Interneurone corps cellulaire (rouge), arbre dendritique (rouge) et axone (noir). Tiré de (Bertrand et Lacaille, 2001).

Du positionnement axonal on peut en déduire les cibles de l'interneurone ainsi que sa fonction, selon qu'il se termine sur la région dendritique d'une cellule pyramidale (où il contrôle alors les entrées synaptiques de la cellule) ou sur la région périsonomatique de cette cellule pyramidale (où il contrôle alors la sortie d'information de la cellule) (Freund, 2003).

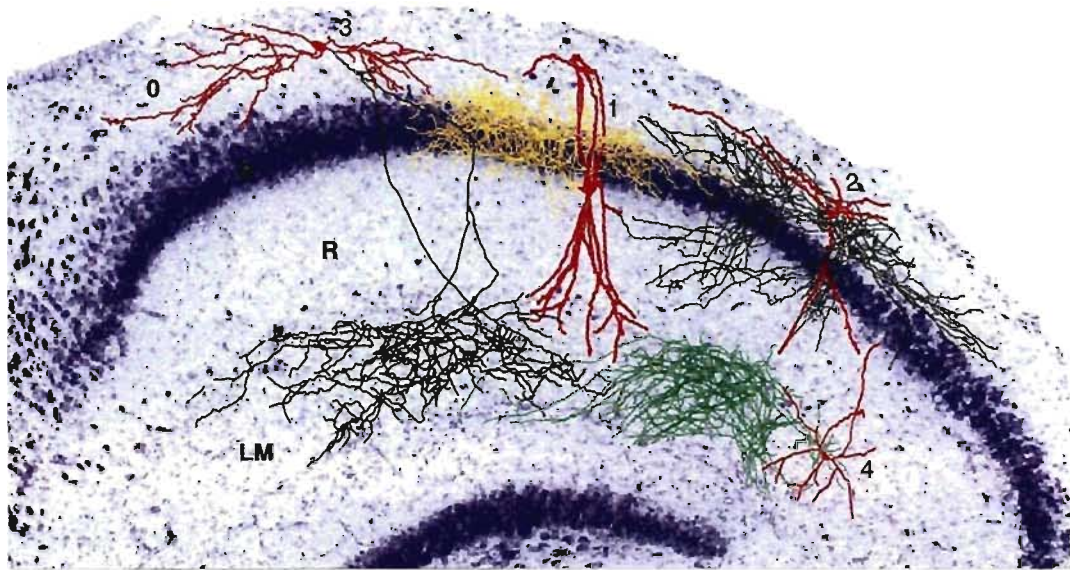


Figure 8. Exemple de la diversité morphologique des interneurons de la région CA1.

Représentation de 4 interneurons différents de la région CA1 : interneurons à panier (1, jaune), interneurone bistratifié (2, noir), interneurone *oriens-lacunosum moleculare* (3, noir) et interneurone associé à la voie perforante (4, vert). L'arbre dendritique est présenté en rouge dans les 4 cellules. Tiré de (Cossart et al., 1998).

L'identification de l'expression différentielle de certains gènes est une autre méthode de différenciation des interneurons. L'expression (ou l'absence de celle-ci) de différentes molécules devient ainsi la signature moléculaire de certains interneurons. Ces molécules peuvent être des protéines qui lient le calcium (parvalbumine (PV), calbindine et calrétinine), des neuropeptides (somatostatine, neuropeptide Y (NPY), cholecystokinine (CCK), polypeptide intestinal vasoactif (VIP), enképhaline et neurokinine), des enzymes (synthétase d'oxyde nitrique) ou des récepteurs (au glutamate, au GABA, aux monoamines, à l'acétylcholine, aux opiacés et à la substance P) (Freund et Buzsaki, 1996). On comprend vite que la diversité des interneurons de la seule région CA1 de l'hippocampe est grande et qu'aucun des identifiants (morphologique, moléculaire ou localisation) est suffisant, à lui seul, pour distinguer le type cellulaire d'un interneurone. Ce n'est que la concurrence de plusieurs de ces indices qui permet de mieux cibler le type

cellulaire (Figure 8). Nous utiliserons donc ici la classification de Somogyi (Somogyi et Klausberger, 2005).

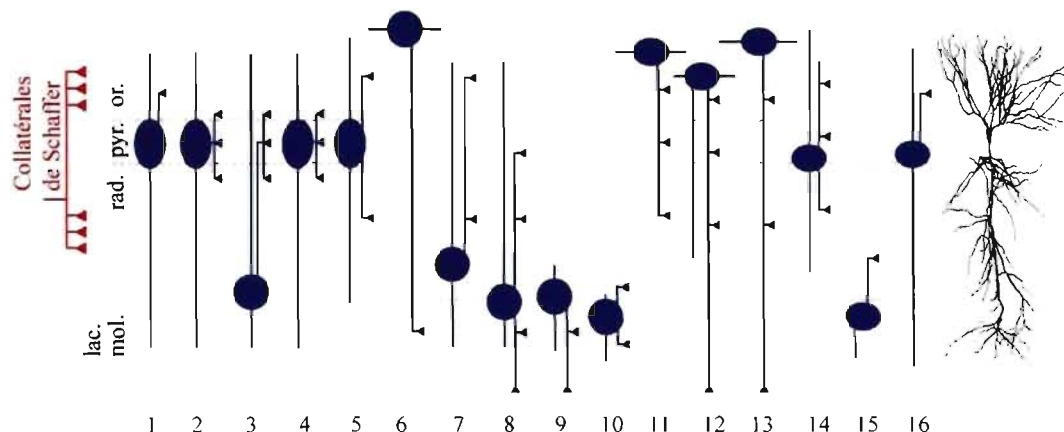


Figure 9. 16 sous types d'interneurones dans la région CA1 de l'hippocampe.

1= Interneurone axo-axoniques (PV+). 2= Interneurone à panier (PV+, CCK-). 3= Interneurone à panier (PV-, CCK+, VIP-, VGLUT3+). 4= Interneurone à panier (PV-, CCK+, VIP+, VGLUT3-). 5= Interneurone bistratifié (PV+, somatostatine+, NPY+, GABAA+, CCK-). 6= Interneurones O-LM (PV+, somatostatine+, mGluR1a+, input presynaptique mGluR7a+). 7= Interneurone associé aux collatérales de Schaffer (CCK+, calbindine+, somatostatine-, NPY-). 8 et 9= Interneurones de la couche *lacunosum moleculare*. 10= Interneurone de forme neurogliale. 11= Interneurone trilaminaire (récepteur m2+, mGluR8a présynaptique, calbindin-). 12= Interneurone de rétroprojection. 13= Interneurone de projection hippocamposéptal (calbindine+, somatostatine+). 14, 15 et 16= Interneurones spécifiques aux interneurones Adapté de (Somogyi et Klausberger, 2005).

2.2.2.2.1 Interneurones axo-axoniques (PV+).

Interneurone #1 sur le schéma de la Figure 9. Ces interneurones, dont le corps cellulaire est normalement dans la couche pyramidale, semblent contacter préférentiellement le segment initial de l'axone des cellules pyramidales (Somogyi et al., 1983). Les dendrites des interneurones axo-axoniques (PV+) sont dans les couches *oriens*, *radiatum* et *lacunosum moleculare* (Sik et al., 1995).

2.2.2.2.2 Interneurones à panier (PV+, CCK-).

Interneurone #2 sur le schéma de la Figure 9. Les dendrites de ces interneurones se prolongent dans la couche *oriens*, dans la couche *radiatum* et aussi dans la couche *lacunosum moleculare* (Sik et al., 1995) et peuvent donc être activés par les collatérales de Schaffer. Ces interneurones contactent principalement la région périsomatique des cellules pyramidales (Buhl et al., 1994) et libèrent ainsi du GABA dans la couche *radiatum* et *pyramidale*. Leur signature moléculaire est parvalbumine positive (PV+) et cholécystokinine négative (CCK-) (Somogyi et Klausberger, 2005). Ces interneurones contactent aussi d'autres interneurones qui semblent être préférentiellement PV+ (Sik et al., 1995).

2.2.2.2.3 Interneurones à panier (PV-, CCK+, VIP-, VGLUT3+).

Interneurone #3 sur le schéma de la Figure 9. Ce type d'interneurone se distingue par la présence du transporteur de glutamate de type 3 (VGLUT3) (Somogyi et al., 2004). Les dendrites de ces interneurones arborisent dans les couches *radiatum*, *pyramidale* et *oriens* et peuvent donc être activées par les collatérales de Schaffer. L'axone de ces interneurones peut projeter dans les couches *radiatum*, *pyramidale* et *oriens* (Somogyi et al., 2004).

2.2.2.2.4 Interneurones à panier (PV-, CCK+, VIP+, VGLUT3-).

Interneurone #4 sur le schéma de la Figure 9. Les dendrites de ces interneurones s'étendent de la couche *lacunosum moleculare* jusqu'à la couche pyramidale ou *oriens* (Pawelzik et al., 2002) et sont donc activées par les collatérales de Schaffer. Ces interneurones libèrent du GABA sur les cellules pyramidales au niveau des dendrites proximaux (couche *radiatum*) et du corps cellulaire (couche pyramidale) (Harris et al., 1985; Nunzi et al., 1985).

2.2.2.2.5 Interneurones bistratifiés (PV+, somatostatine+, NPY+, GABAA+, CCK-).

Interneurone #5 sur le schéma de la Figure 9. Les dendrites de ces interneurones s'étendent dans la couche *radiatum* et *oriens* mais ne pénètrent pas la couche *lacunosum moleculare* (Buhl et al., 1994; Pawelzik et al., 2002). L'arborisation

axonale très large de ces interneurons calque la distribution des collatérales de Schaffer (Buhl et al., 1994). Leur signature moléculaire est PV+, CCK-, somatostatine et neuropeptide Y positifs (Somogyi et Klausberger, 2005).

2.2.2.2.6 Interneurones O-LM (PV+, somatostatine+, mGluR1a+, input presynaptique mGluR7a+).

Interneurone #6 sur le schéma de la Figure 9. Le corps cellulaire et les dendrites s'étendent de façon horizontale surtout dans la couche *oriens* alors que l'axone projette principalement dans la couche *lacunosum moleculare* où il forme des connexions avec les dendrites distales des cellules pyramidales (McBain et al., 1994).

2.2.2.2.7 Interneurones associés aux collatérales de Schaffer (CCK+, calbindine+, somatostatine-, NPY-).

Interneurone #7 sur le schéma de la Figure 9. Le corps cellulaire de ces interneurons est localisé directement dans le champ innervé par les collatérales de Schaffer, les afférences du cortex entorhinal et les fibres commissurales (Vida et al., 1998). L'axone reste dans la couche *radiatum* et inhibe proactivement les pyramidales de la région CA1 (McBain et Fisahn, 2001).

2.2.2.2.8 Interneurones de la couche *lacunosum moleculare*.

Interneurones #8 et 9 sur le schéma de la Figure 9. Ces interneurons sont différenciés par l'étendue de leur arborisation axonale. Dans le premier cas l'axone projette aux couches *lacunosum-moleculare*, *radiatum*, *pyramidale* et à l'occasion à la couche *oriens* (Lacaille et Schwartzkroin, 1988a, b; Parra et al., 1998). Dans le deuxième cas, l'axone est confiné à la couche *lacunosum-moleculare* (Somogyi et Klausberger, 2005). L'axone de ces interneurons projette parfois hors de la région CA1 et atteint le gyrus dentelé (Lacaille et Schwartzkroin, 1988b). Ces interneurons peuvent être activés, entre autres, par la stimulation des collatérales de Schaffer (Lacaille et Schwartzkroin, 1988a, b; Somogyi et Klausberger, 2005).

2.2.2.2.9 Interneurones neurogliaforme.

Interneurone #10 sur le schéma de la Figure 9. Ces interneurones ont un champ dendritique étoilé mais peu étendu et limité dans les couches *lacunosum moleculare* et *radiatum* (Vida et al., 1998). Leur arborisation axonale est aussi très compacte et se situe dans les couches *lacunosum moleculare* et dans le *radiatum* (Vida et al., 1998).

2.2.2.2.10 Interneurones trilaminaires (récepteur m2+, mGluR8a présynaptique, calbindin-).

Interneurone #11 sur le schéma de la Figure 9. Il semble que le corps cellulaire et les dendrites de ces interneurones sont situés dans la couche *oriens* (Sik et al., 1995). L'axone de ces cellules contacte plusieurs couches (*oriens*, pyramidale et *radiatum*) (Sik et al., 1995) et même d'autres régions de la formation hippocampique (Somogyi et Klausberger, 2005).

2.2.2.2.11 Interneurones de rétroprojection.

Interneurone #12 sur le schéma de la Figure 9. Il existe peu de données sur ce type d'interneurones mais il semble que par leur arborisation dendritique vaste et étendue, ces cellules peuvent être activées par les collatérales de Schaffer de la couche *radiatum* (Sik et al., 1995). Les axones de ces cellules peuvent contacter des régions étendues de la région CA1 et CA3 (Sik et al., 1995).

2.2.2.2.12 Interneurones de projection hippocamptoseptal (calbindine+, somatostatine+).

Interneurone #13 sur le schéma de la Figure 9. Les dendrites de ces interneurones semblent confinés à la couche *oriens* (Zappone et Sloviter, 2001). L'axone de ces cellules cible d'autres interneurones hippocampiques dans les couches *oriens*, pyramidale et *radiatum* (Gulyas et al., 2003) mais projette également au *septum* (Toth et al., 1993).

2.2.2.2.13 Interneurones spécifiques aux interneurones.

Interneurone #14, 15 et 16 sur le schéma de la Figure 9. Cette famille d'interneurones cible préférentiellement d'autres interneurones (Acsady et al., 1996a; Acsady et al., 1996b). Selon la cellule, les dendrites peuvent s'étendre sur différentes couches de la région CA1 (Acsady et al., 1996a; Acsady et al., 1996b). Leurs axones contactent préférentiellement d'autres interneurones (Acsady et al., 1996a; Acsady et al., 1996b).

2.2.2.3 FONCTION DES INTERNEURONES DE LA RÉGION CA1

Les interneurones jouent un rôle inhibiteur essentiel dans le contrôle de l'excitabilité des neurones de projection (Jonas et al., 2004). Les interneurones ont, en général, une résistance membranaire élevée et un potentiel de repos dépolarisé, ce qui en fait des cellules facilement excitables (Lawrence et McBain, 2003; Jonas et al., 2004). En libérant du GABA, les interneurones hyperpolarisent les cellules pyramidales (ou augmentent la conductance des courants sortants), ce qui réduit l'efficacité des afférences excitatrices à dépolariser les pyramidales. Sur la base de leurs interconnexions synaptiques, les interneurones du CA1 génèrent trois types d'inhibition (Figure 10).

2.2.2.3.1 Inhibition proactive

L'inhibition proactive résulte de l'activation d'une voie synaptique qui excite à la fois les pyramidales et les interneurones et ces derniers inhibent les cellules pyramidales (Figure 10). Il en résulte une excitation des cellules pyramidales dont la durée est contrôlée par l'inhibition proactive, qui permet ainsi une régulation fine de la fenêtre temporelle d'activation (Pouille et Scanziani, 2001). Les interneurones de la couche *radiatum* et *lacunosum moleculare* qui reçoivent les collatérales de Schaffer et qui contactent les pyramidales de la région CA1 produisent l'inhibition proactive (Schwartzkroin et Mathers, 1978; Lacaille et Schwartzkroin, 1988a, b).

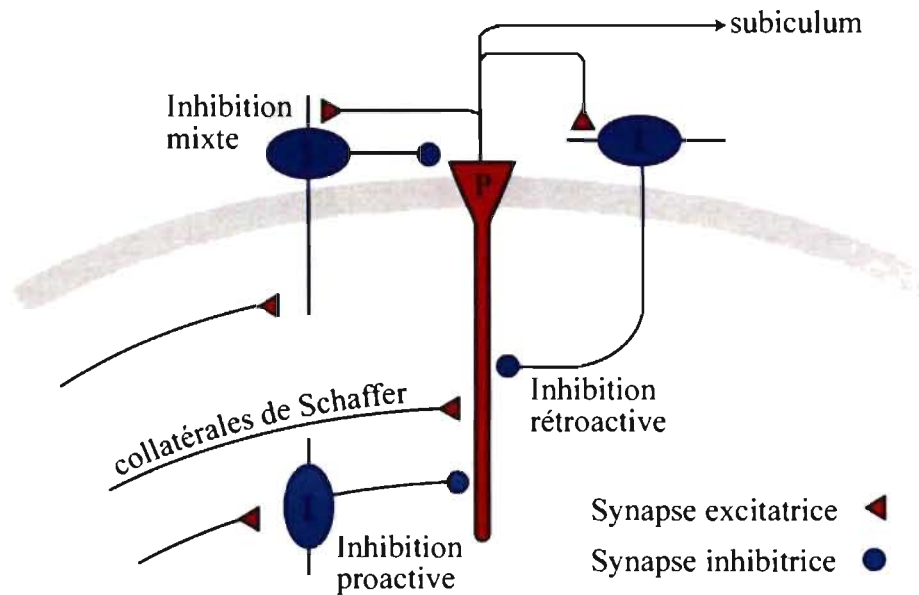


Figure 10. Différents mécanismes d'inhibition

Schéma des connexions synaptiques entre les neurones de projection et les interneurons générant trois types d'inhibition. Adapté de (Andersen, 2007).

2.2.2.3.2 Inhibition rétroactive

L'inhibition rétroactive survient lorsqu'une cellule pyramidale excite, via une fibre d'axone locale, un interneurone qui à son tour inhibe la même pyramidale (Figure 10). Il s'agit d'une boucle de rétroaction inhibitrice (Nurse et Lacaille, 1997) qui produit une période d'inhibition des cellules pyramidales à la suite de leur activation. Lacaille et collaborateurs ont montré que les interneurons de la couche *oriens* sont directement activés par les pyramidales, contactent à leur tour les cellules pyramidales et produisent une inhibition rétroactive (Lacaille et al., 1987; Blasco-Ibanez et Freund, 1995).

2.2.2.3.3 Inhibition mixte

Dans certains cas, les interneurons sont excités à la fois par les collatérales de Schaffer et par les cellules pyramidales de la région CA1 (Figure 10). Ces interneurons inhibent ensuite ces mêmes cellules pyramidales de la région CA1. Ces interneurons sont donc capables d'inhibition proactive et d'inhibition

rétroactive. Dans la région CA1, les interneurones de la couche *oriens* (Lacaille et al., 1987; Lacaille et Williams, 1990), les cellules à panier et les interneurones axo-axoniques (Buhl et al., 1994; Sik et al., 1995) produisent une inhibition mixte.

2.2.2.3.4 Régulation de l'activité oscillatoire

L'enregistrement de l'activité électroencéphalographique dans l'hippocampe montre que des rythmes oscillatoires particuliers sont générés pendant différents comportements (Winson, 1978; Bland, 1986; Buzsaki, 2002). Les oscillations à la fréquence *thêta* (4-10 Hz) surviennent pendant l'exécution de mouvements volontaires, l'exploration d'un environnement, la mémorisation ou le sommeil paradoxal (Winson, 1978; Bland, 1986; Buzsaki, 2002). Les oscillations à la fréquence *gamma* (30-80 Hz) sont enregistrées chez l'animal éveillé, anesthésié ou durant le sommeil paradoxal (Faulkner et al., 1998). Finalement, les oscillations rapides (120-200 Hz) sont observées lors de périodes d'immobilité et durant certaines phases du sommeil (Freund et Buzsaki, 1996). Ces rythmes oscillatoires sont générés par l'activation synchrone de populations de cellules principales (Buzsaki, 2002). Cette activité oscillatoire pourrait jouer un rôle dans l'association, l'intégration et la détection de la coïncidence des différentes entrées synaptiques (Singer, 1999; Buzsaki, 2002). Le réseau inhibiteur de l'hippocampe est particulièrement important pour l'induction et le maintien de cette activité oscillatoire (Freund et Buzsaki, 1996). Les interneurones régulent l'activité oscillatoire en définissant des fenêtres temporelles d'inhibition espacées de fenêtres d'excitation (Chrobak et Buzsaki, 1998). Cette inhibition rythmique restreint la période de temps pendant laquelle les pyramidales sont excitables et peuvent intégrer différentes entrées synaptiques. Ainsi, un signal synaptique qui coïncide avec la période inhibée de l'activité oscillatoire sera inefficace à produire un potentiel d'action dans la cellule pyramidale et ne sera donc pas transmis au relais suivant. Chaque type d'interneurone contribue de façon particulière à réguler l'activité oscillatoire (Somogyi et Klausberger, 2005).

Il est maintenant reconnu que les interneurones régulent l'activité dans l'hippocampe. L'activité dans l'hippocampe est affectée par l'efficacité de la transmission synaptique entre les différents neurones.

2.3 TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS LA RÉGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE

La synapse est une zone spécialisée où a lieu la transmission synaptique entre deux compartiments fonctionnels neuronaux hautement spécialisés : la zone active présynaptique et la densité postsynaptique. De plus, les cellules gliales sont aujourd'hui considérées comme des éléments essentiels dans l'organisation anatomique de la synapse. La transmission synaptique est à la base du transfert d'information dans le cerveau (Kandel et al., 2000). Dans un contexte global, les mécanismes finement régulés de la transmission synaptique comprennent, entre autres, la libération de neurotransmetteurs par l'élément présynaptique, l'activation de récepteurs postsynaptiques, la diffusion de neurotransmetteur dans l'espace extrasynaptique, l'activation de récepteurs extrasynaptiques, l'activation de récepteurs gliaux et la libération de gliotransmetteurs. Pour fins de simplification, nous présenterons ici la libération de neurotransmetteurs par l'élément présynaptique et l'activation de récepteurs postsynaptiques.

2.3.1.1 ZONE ACTIVE ET LIBÉRATION PRÉSYPNAPTIQUE DE NEUROTRANSMETTEURS

La terminaison présynaptique possède des vésicules remplies de neurotransmetteurs (Kandel et al., 2000) (Figure 11). Il existe trois populations de vésicules à la terminaison : la première est la population de vésicules de réserve, amarrées au cytosquelette par des protéines nommées synapsines; la deuxième population de vésicules synaptiques est amarrée à la membrane présynaptique et est prête pour la relâche immédiate (Harris et Sultan, 1995); et la troisième est la population de vésicules à cœur dense contenant des neuropeptides. Toute une machinerie régulatrice est responsable de l'exocytose des vésicules. Il s'agit d'un complexe formé entre les canaux calciques (Robitaille et al., 1990), les protéines

de la vésicule (VAMP et synaptotagmine), les protéines de la membrane présynaptique (SNAP-25, syntaxine et neurexine) et le pore de fusion (Jahn et Scheller, 2006). L'arrivée du potentiel d'action à la terminaison synaptique active des canaux calciques, dont l'ouverture dépend du potentiel membranaire et permet l'entrée de calcium. Cette entrée d'ions de calcium est essentielle pour permettre la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique et pour ouvrir le pore de fusion qui produit l'exocytose du neurotransmetteur contenu dans la vésicule vers la fente synaptique (Jahn et Scheller, 2006).

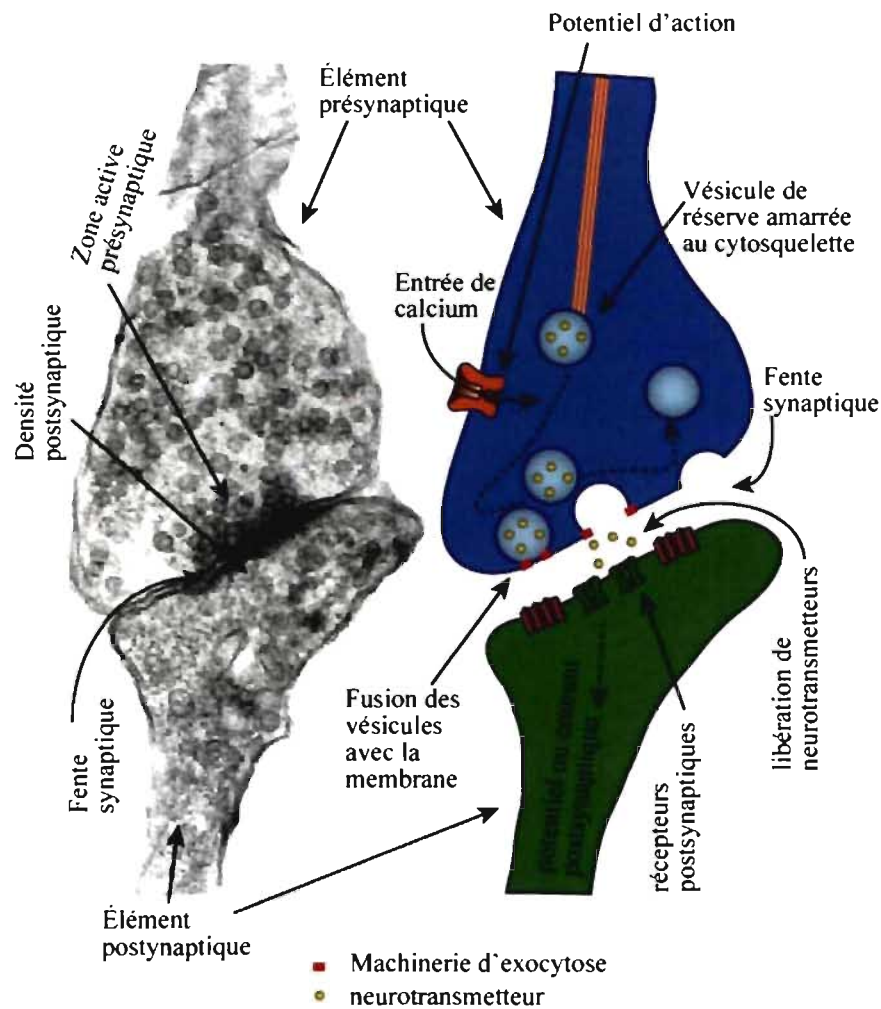


Figure 11. Organisation de la synapse.

Coupe en microscopie électronique (gauche) et schéma (droite) de la structure et l'organisation synaptique. L'élément présynaptique est identifiable par la présence de vésicules synaptiques qui contiennent le neurotransmetteur et par la présence des protéines spécialisées de la zone

active (Kandel et al., 2000). La fente synaptique apparaît relativement dense car elle contient des molécules d'adhésion intercellulaires (Kandel et al., 2000). La densité postsynaptique contient les récepteurs membranaires (Kandel et al., 2000). Adapté de (Andersen, 2007).

2.3.1.2 DENSITÉ POSTSYNAPTIQUE ET RÉCEPTEURS

Les neurotransmetteurs libérés par l'élément présynaptique activent, entre autres, les récepteurs postsynaptiques. Il existe deux populations de récepteurs postsynaptiques : les récepteurs synaptiques en apposition directe du site de libération des neurotransmetteurs (Robitaille et al., 1990) et les récepteurs extrasynaptiques, plus susceptibles d'être activés par la diffusion des neurotransmetteurs ou des gliotransmetteurs (Huang et Bergles, 2004). Étant donné le nombre de neurotransmetteurs et la diversité des récepteurs spécifiques, les conséquences de l'activation des récepteurs postsynaptiques par les neurotransmetteurs peuvent être variées. Ces effets peuvent varier en qualité (excitation ou inhibition) et en magnitude (d'un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE) à un potentiel d'action). C'est donc le type de neurotransmetteur et de récepteur qui détermine le courant postsynaptique induit. Dans les sections suivantes sont décrits les récepteurs des quatre neurotransmetteurs importants à notre étude : le glutamate, le GABA, l'adénosine et l'ATP.

2.3.1.2.1 Récepteurs au glutamate.

Les récepteurs au glutamate comprennent deux types fondamentalement différents de récepteurs : les récepteurs canaux ou ionotropes et les récepteurs à sept segments transmembranaires ou métabotropes couplés aux protéines G (Riedel et al., 2003) (Tableau I; Figure 12).

Tableau I. Agonistes et antagonistes usuels des récepteurs au glutamate.

Récepteur	Agoniste	Antagoniste
NMDA	NMDA	AP-V
AMPA	AMPA	GYKI 52466

KA	Kainate	UBP 296
mGluR gr.I	DHPG	MPEP/LY367385
mGluR gr.II	APDC	EGLU
mGluR gr.III	L-AP4	MSOP

NMDA = N-méthyl-D-aspartate

AP-V = acide (\pm)-amino-5-phosphopentanoïque

AMPA = acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique

GYKI 52466 = 4-(8-Méthyl-9H-1,3-dioxolo [4,5-h] [2,3]benzodiazépin-5-y 1)-benzenamine hydrochloride

UBP 296 = (RS)-1-(2-Amino-2-carboxyéthyl)-3-(2-carboxybenzyl)pyridine-2,4-dione

DHPG = (R,S)-3,5-dihydroxyphenylglycine

DCG IV = (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxycyclopropyl)glycine

L-AP4 = acide L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyrique

MPEP = 2-Méthyl-6-(phényléthynyl)pyridine hydrochloride

LY367385 = acide (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-méthylbenzèneacétique

EGLU = acide (2S)- α -Éthylglutamique

MSOP = (RS)- α -Méthylserine-O-phosphate

2.3.1.2.1.1 Les récepteurs ionotropes au glutamate.

Les récepteurs ionotropes au glutamate sont divisés en 3 sous-types selon l'agoniste qui les active spécifiquement (Dingledine et al., 1999) : les récepteurs de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Wisden et Seeburg, 1993; Dingledine et al., 1999; Mayer et Armstrong, 2004), de type acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA) (Keinanen et al., 1990; Lee et al., 1998; Dingledine et al., 1999) et de type kainate (Wisden et Seeburg, 1993; Dingledine et al., 1999; Mayer et Armstrong, 2004).

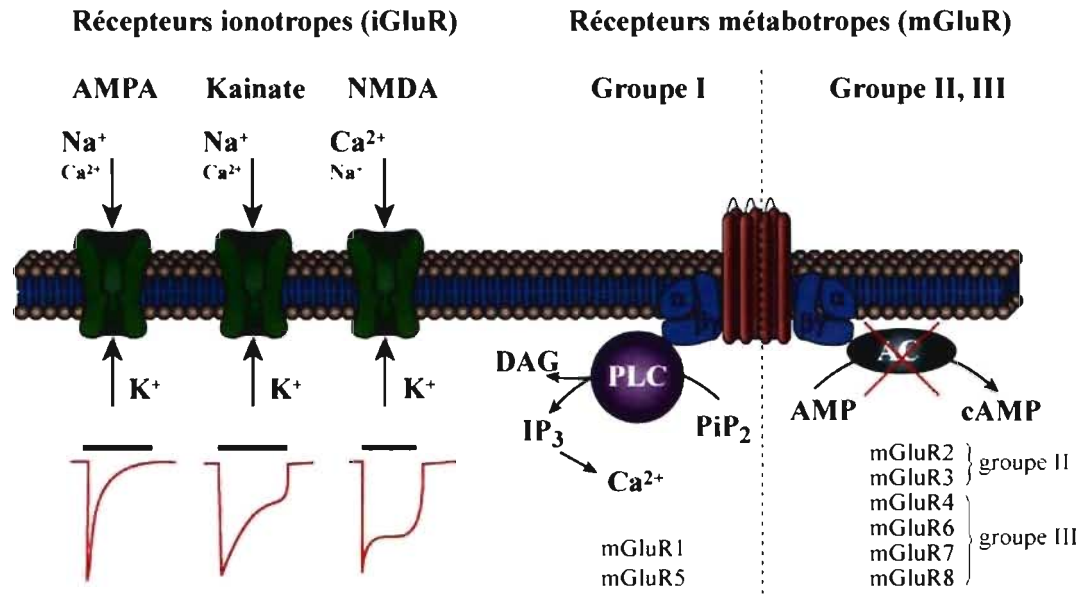


Figure 12. Types de récepteurs au glutamate.

Les récepteurs AMPA, kainate et NMDA (gauche) sont des récepteurs ionotropes au glutamate mais leurs propriétés font que leurs courants désensibilisent différemment (Sun et al., 2002). Les récepteurs métabotropes (droite) sont couplés à des cascades moléculaires de seconds messagers. Schéma adapté de Verkhratsky et Kirchhoff (2007).

2.3.1.2.1.2 La structure des récepteurs ionotropes au glutamate.

Chaque récepteur ionotrope au glutamate de type NMDA est formé de quatre sous unités qui constituent un tétramère (Wisden et Seeburg, 1993; Dingledine et al., 1999; Mayer et Armstrong, 2004). Les récepteurs NMDA sont composés de différentes combinaisons des sous-unités NR1, NR2A, NR2B, NR2C et NR2D et parfois NR3A ou NR3B (Wisden et Seeburg, 1993; Dingledine et al., 1999; Mayer et Armstrong, 2004) dont la distribution est régionalisée (Laurie et al., 1995). Toutes ces sous-unités possèdent une structure générale similaire avec un domaine N-terminal extracellulaire, 3 segments transmembranaires (M1, M2 et M4), une boucle intramembranaire (M2) et un domaine C-terminal intracellulaire (Tingley et al., 1993; Chung et al., 2004; Martineau et al., 2006). Les récepteurs NMDA sont habituellement constitués de 2 sous-unités NR1 et 2 sous-unités NR2 (Clements et Westbrook, 1991; Laube et al., 1998).

L'activation des récepteurs NMDA est dépendante de trois conditions. Premièrement, la liaison du glutamate au récepteur. Deuxièmement la liaison d'un coagoniste (glycine ou D-sérine) (Johnson et Ascher, 1987; Kleckner et Dingledine, 1988; Salt, 1989; Brugger et al., 1990; Panatier et al., 2006). Troisièmement, la dépolarisation du potentiel membranaire (Wisden et Seeburg, 1993; Dingledine et al., 1999; Mayer et Armstrong, 2004). La dépendance de la perméabilité des récepteurs NMDA au potentiel membranaire est causée par des ions Mg^{2+} qui bloquent le canal à des voltages hyperpolarisés (Figure 13). Lorsque le neurone est dépolarisé, l'ion Mg^{2+} est expulsé hors du canal du récepteur NMDA permettant ainsi l'entrée d'ions Na^+ et Ca^{2+} et la sortie d'ions K^+ (MacDermott et al., 1986; Dingledine et al., 1999). En absence de Mg^{2+} dans le milieu, la conductance des récepteurs NMDA n'est plus affectée par le potentiel membranaire de la cellule (Figure 13) (Nowak et al., 1984). La conductance des récepteurs NMDA nécessite donc la présence simultanée de glutamate, d'un coagoniste et d'une dépolarisation membranaire suffisante pour enlever l'ion Mg^{2+} . Finalement, la perméabilité du récepteur NMDA montre peu de désensibilisation (voir Figure 12) (Sun et al., 2002) et peut aussi être modulée par la phosphorylation du domaine C-terminal (Tingley et al., 1993; Chung et al., 2004).

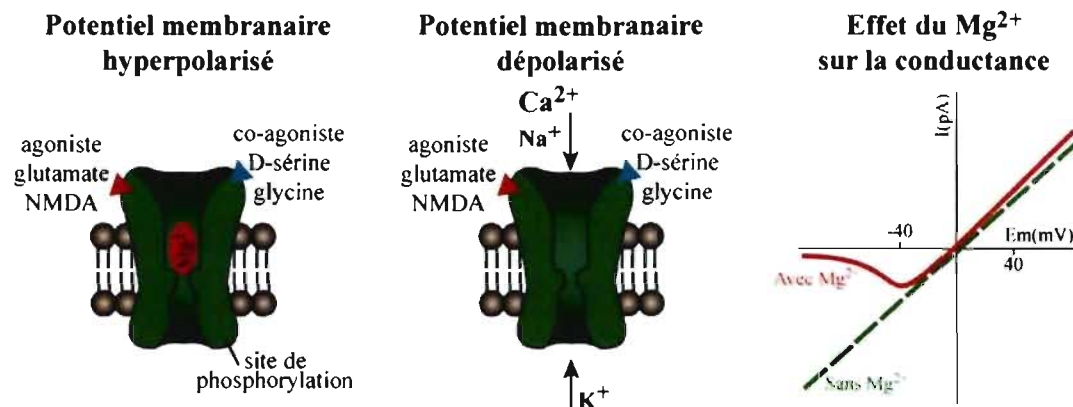


Figure 13. Le blocage par le Mg^{2+} des récepteurs NMDA.

À des potentiels membranaires hyperpolarisés, le récepteur NMDA est bloqué par les ions Mg^{2+} (gauche) et nécessite une dépolarisation pour

expulser l'ion Mg^{2+} et rendre le canal perméable (centre et droite, courbe orange). En absence de Mg^{2+} , la conductance du canal ne dépend plus du voltage (droite, courbe verte). Adapté de (Nowak et al., 1984).

Les récepteurs AMPA sont composés des sous-unités GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4 (Keinanen et al., 1990; Wisden et Seeburg, 1993; Lee et al., 1998; Mayer et Armstrong, 2004). Plusieurs combinaisons permettent de former des récepteurs différents et ces variations déterminent les propriétés fonctionnelles du récepteur. Contrairement aux récepteurs NMDA, la perméabilité des récepteurs AMPA n'est pas dépendante ni de la présence d'un coagoniste ni du Mg^{2+} (Riedel et al., 2003). Une fois activés par le glutamate, les récepteurs AMPA sont perméables au Na^+ et au K^+ mais peuvent être aussi perméables au Ca^{2+} s'ils possèdent une sous-unité GluR2 modifiée ou pas de sous-unité GluR2 (Riedel et al., 2003). La conductance d'un type particulier de récepteurs AMPA perméables au Ca^{2+} dépend du voltage et montre une rectification entrante du courant lorsque les polyamines intracellulaires bloquent le canal (Donevan et Rogawski, 1995). Les récepteurs AMPA se désensibilisent très rapidement lors de leur activation par le glutamate (Riedel et al., 2003).

Les récepteurs kainate sont formés des sous-unités GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2 (Wisden et Seeburg, 1993; Mayer et Armstrong, 2004). Comme les récepteurs AMPA, les récepteurs kainate sont principalement perméables au Na^+ et au K^+ et leur perméabilité n'est pas dépendante du Mg^{2+} (Riedel et al., 2003).

2.3.1.2.1.3 Les récepteurs métabotropes au glutamate.

Le glutamate active aussi une deuxième classe de récepteurs : les récepteurs métabotropes. Contrairement aux récepteurs ionotropes, les récepteurs métabotropes au glutamate (mGluR) ne sont pas des récepteurs-canaux. Ce sont des récepteurs à 7 segments transmembranaires qui activent une cascade moléculaire couplée à des second messagers intracellulaire (Sladeczek et al., 1985). Il existe huit sous-types de récepteurs mGluR (mGluR1 à mGluR8), qui

sont classés en trois groupes selon la nature de leurs seconds messagers (Pin et Duvoisin, 1995; Bhave et al., 2001; Riedel et al., 2003).

Les récepteurs métabotropes du groupe I comprennent les mGluR1 et mGluR5 (Pin et Duvoisin, 1995; Riedel et al., 2003). Ces récepteurs activent la phospholipase C, une enzyme qui converti le phosphatidyl-inositol-bis-phosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) et produit le diacylglycérol (DAG) (Pin et Duvoisin, 1995; Bhave et al., 2001; Riedel et al., 2003). Le DAG facilite l'activation de la protéine kinase C (PKC) alors que l'IP₃ active un récepteur intracellulaire spécifique et libère le calcium des réserves intracellulaires vers le cytoplasme (Riedel et al., 2003).

Les récepteurs mGluRs du groupe II comprennent les récepteurs mGluR2 et mGluR3, tandis que les récepteurs du groupe III comprennent les mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 (Pin et Duvoisin, 1995; Riedel et al., 2003). Les récepteurs mGluR des groupes II et III inhibent l'activité de l'adénylate cyclase Nakanishi (1994), une enzyme qui transforme l'AMP en AMPc (Pin et Duvoisin, 1995; Bhave et al., 2001; Riedel et al., 2003). L'effet de ces récepteurs est produit par une cascade métabolique impliquant la protéine Gi (Pin et Duvoisin, 1995).

2.3.1.2.2 Les récepteurs au GABA

Comme pour les récepteurs au glutamate, il existe deux familles de récepteurs au GABA : les récepteurs ionotropes GABA_A et GABA_C et les récepteurs métabotropes GABA_B (Figure 14).

Tableau II. Agonistes et antagonistes usuels des récepteurs au GABA.

Récepteur	Agoniste	Antagoniste
GABA _A	muscimol	picrotoxine ¹ / bicuculline ²
GABA _C	TACA	TPMPA
GABA _B	baclofen	CGP55845

¹ antagoniste non-compétitif qui bloque le pore.

² antagoniste compétitif qui occupe le site de liaison du GABA.

TACA = acide trans-4-Aminocrotonique.

TPMPA = (1,2,5,6 – tetrahydropyridin – 4 - yl) acide methylphosphinique.

CGP55845 = (2S) – 3 - [[(1S) – 1 - (3,4 - dichloropheny) ethyl] amino – 2 - hydroxypropyl] (phenylmethyl) acide phosphinique.

2.3.1.2.2.1 Les récepteurs ionotropes au GABA

Les récepteurs GABA_A et GABA_C sont des récepteurs canaux pentamériques perméables aux ions Cl⁻ et carbonate (HCO₃⁻) (Nayeem et al., 1994). Il existe au moins 15 sous-unités identifiées formant les récepteurs GABA_A (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ, θ et π) (Fritschy et Brunig, 2003). Trois sous unités de la structure des récepteurs GABA_C ont été identifiées à ce jour (ρ1, ρ,2 et ρ3) (Enz et Cutting, 1998). Les récepteurs GABA_C semblent surtout présents dans la rétine (Enz et Cutting, 1998) et sont insensibles aux modulateurs typiques des récepteurs GABA_A comme les benzodiazépines et la bicuculline. Dans l'hippocampe, les différentes sous-unités de récepteurs GABA_A ne sont pas distribuées de façon uniforme (Sieghart et Sperk, 2002; Benarroch, 2007).

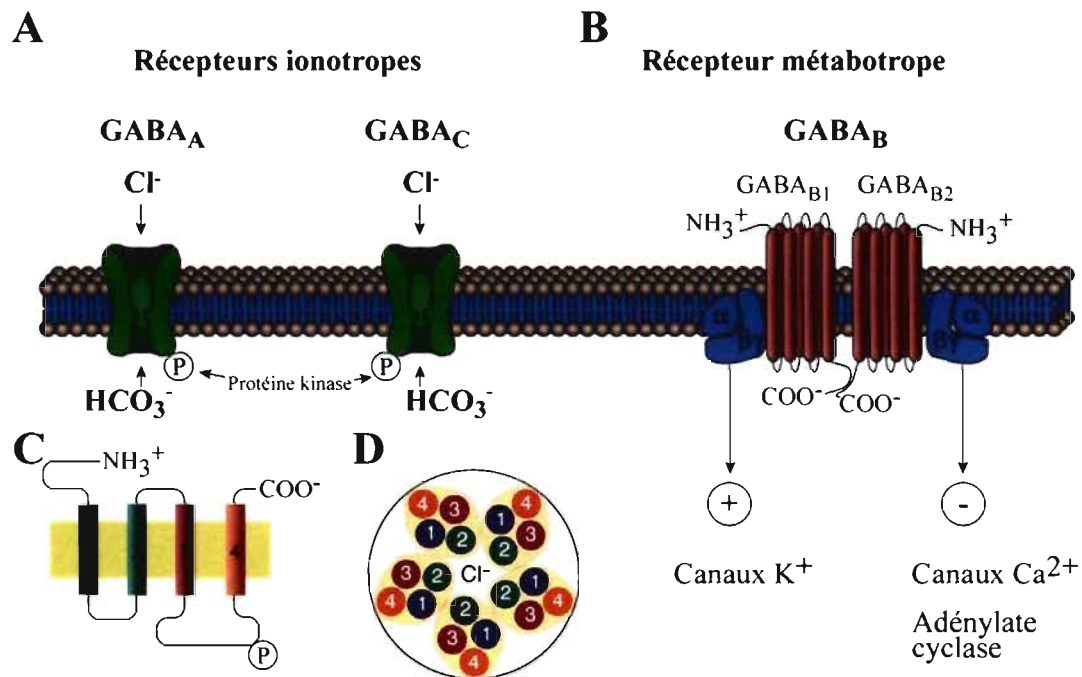


Figure 14. Types de récepteurs au GABA.

A) Les récepteurs ionotropes GABA_A et GABA_C sont perméables principalement au Cl⁻ et modulés par la phosphorylation via les protéines kinase A et C (Bormann, 2000). **B)** Les récepteurs GABA_B sont des hétérodimères et possèdent une sous-unité GABA_{B1} et une sous-unité GABA_{B2}. L'activation des récepteurs GABA_B peut activer des canaux potassiques, inhiber des canaux calciques ou inhiber l'adénylate cyclase. **C)** Les sous-unités des récepteurs ionotropes au GABA possèdent 4 segments transmembranaires. **D)** 5 sous unités (vues du haut) s'associent pour former un récepteur avec un pore perméable aux ions Cl⁻ au centre. Adapté de (Andersen, 2007).

2.3.1.2.2.2 Les récepteurs métabotropes au GABA

Les récepteurs GABA_B sont des récepteurs métabotropes sensibles au GABA. Ce type de récepteurs est formés de protéines à sept segments transmembranaires (Figure 14). Deux protéines, GABA_{B1} et GABA_{B2} doivent s'agencer pour former un récepteur fonctionnel (Jones et al., 1998). Les agencements homomériques ne forment pas de récepteurs fonctionnels (Jones et al., 1998). La protéine GABA_{B1} semble être la seule à présenter différentes variantes (GABA_{B1a} à g) issues d'épissage alternatif (Bettler et al., 2004).

L'activation des récepteurs GABA_B déclenche une cascade de seconds messagers impliquant les protéines G α_i et G α_o mais aussi le dimère G $\beta\gamma$. Les protéines G α_i et G α_o sont couplées négativement à l'activité de l'adénylate cyclase (Hill, 1985). Il semble que le dimère G $\beta\gamma$ soit couplé négativement aux canaux calciques dépendant du voltage de type N, P/Q, (Mintz et Bean, 1993) dans les terminaisons présynaptiques qui affectent directement la libération de neurotransmetteurs (Couve et al., 2000). Ainsi, une des conséquences classiques de l'activation des récepteurs GABA_B est l'inhibition présynaptique de la libération de neurotransmetteur (Scholz et Miller, 1991). Cet effet de l'activation des récepteurs GABA_B est spécifique au type cellulaire. Par exemple, l'activation des récepteurs GABA_B entraîne une inhibition des canaux calciques de type T dans les interneurons de la couche *lacunosum moleculare* mais inhibe les canaux de type L dans les cellules granulaires (Hammond, 2001). Au niveau postsynaptique, le dimère G $\beta\gamma$ est couplé positivement aux canaux potassiques à rectification entrante (GIRK). Une autre conséquence classique de l'activation des récepteurs GABA_B postsynaptiques est donc l'activation de canaux K⁺, l'hyperpolarisation de la membrane (Gahwiler et Brown, 1985) et l'inhibition de l'activité neuronale.

2.3.1.2.3 Récepteurs à l'adénosine

L'adénosine est un neurotransmetteur généralement inhibiteur qui agit sur 4 types de récepteurs : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ (Dunwiddie et Masino, 2001). Tous sont des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés, par des protéines G, à une variété de messagers (Dunwiddie et Masino, 2001).

Les récepteurs A₁ activent des canaux K⁺ (Trussell et Jackson, 1985) et inhibent les canaux Ca²⁺ responsables de la libération de neurotransmetteurs (Fredholm et Dunwiddie, 1988); deux effets qui causent l'inhibition de l'activité présynaptique. Les récepteurs A₁ semblent couplés aux protéines G_i et G_o (Dunwiddie et Masino, 2001).

Les récepteurs A_{2A} et A_{2B} augmentent l'activité de l'adénylate cyclase mais les conséquences rapportées d'une telle activation sont variées (activation ou inhibition de canaux Ca^{2+} et de la voie adénylate cyclase et phospholipase C) (Dunwiddie et Masino, 2001). Les récepteur A_{2A} et A_{2B} agissent à travers les protéines G_s et modulent la libération de neurotransmetteurs (Dunwiddie et Masino, 2001). Les récepteurs A_3 sont couplés aux protéines G_i et G_q et modulent l'activité des récepteurs A_1 et mGluR (Dunwiddie et al., 1997; Dunwiddie et Masino, 2001).

Contrairement au glutamate et au GABA, il semble que les neurones ne libèrent pas l'adénosine par le mécanisme vésiculaire classique qui dépend du Ca^{2+} (Dunwiddie et Masino, 2001). De plus, aucune évidence ne montre une synapse où le neurotransmetteur principal soit l'adénosine (Dunwiddie et Masino, 2001). Pourtant, l'adénosine est présente dans l'hippocampe puisque l'application d'un antagoniste des récepteurs à l'adénosine augmente la transmission synaptique excitatrice, suggérant la présence tonique d'adénosine et la présence d'une inhibition basale de la transmission (Delaney et Geiger, 1996). De plus, l'adénosine inhibe la libération de neurotransmetteurs de toutes les synapses excitatrices de l'hippocampe (Dunwiddie et Hoffer, 1980; Dunwiddie et Masino, 2001). L'adénosine ne semble pas réduire la transmission inhibitrice GABAergique suggérant que son effet est spécifique aux fibres excitatrices (Dunwiddie et Masino, 2001). Une des sources principales d'adénosine est la dégradation d'ATP par des enzymes extracellulaires. La section suivante traite de l'ATP et des récepteurs à l'ATP.

2.3.1.2.4 Récepteurs à l'ATP

L'ATP est une molécule ubiquitaire dans le système nerveux central qui est présente dans toutes les cellules (Pankratov et al., 2006). L'ATP est probablement co-libérée avec tout les neurotransmetteurs vésiculaires en plus d'être un gliotransmetteur principal dans la signalisation gliale. Treize récepteurs à l'ATP

ont été identifiés et sont regroupés en deux types : les récepteurs ionotropes P2X (de P2X₁₋₇) et les récepteurs métabotropes couplés par les protéines G à la PLC et à l'adenylyl cyclase nommés P2Y (P2Y_{1,2,4,6,8,11}) (Inoue, 1998a, b). Les conséquences de l'activation de différents récepteurs par l'ATP peuvent être des effets excitateurs tels la stimulation de la libération de glutamate ou la potentialisation de la transmission synaptique (Wieraszko et Seyfried, 1989; Inoue et al., 1992) ou peuvent être des effets inhibiteurs tels que la dépression de la libération de neurotransmetteurs (Koizumi et al., 2003).

La transmission synaptique joue un rôle crucial dans le transfert d'information dans le système nerveux central. Les changements d'efficacité synaptique sont à la base des mécanismes d'apprentissage et les synapses doivent démontrer une flexibilité. La section suivante traite donc de cette capacité "plastique" des synapses d'être modifiées par leur propre expérience.

2.4 PLASTICITÉ SYNAPTIQUE COMME MÉCANISME CELLULAIRE DE LA MÉMOIRE

Une des premières évidences que la transmission synaptique n'est pas statique provient de travaux sur l'aplysie (un invertébré) où une tâche simple d'apprentissage produit une augmentation de l'efficacité synaptique (Castellucci et al., 1970; Castellucci et Kandel, 1976; Castellucci et al., 1978). Différents mécanismes de plasticité synaptique peuvent augmenter l'efficacité synaptique (phénomènes de facilitation ou potentialisation) ou la diminuer (phénomène de dépression) de façon temporaire (phénomène à court-terme) ou de façon plus persistante (phénomène à long-terme) de la même façon que la mémorisation peut être provisoire ou permanente (Castellucci et al., 1978).

La modification à long-terme de la transmission synaptique est considérée comme un mécanisme à la base de l'apprentissage et de la mémoire (Lynch, 2004). Pour

ses similitudes avec les mécanismes d'apprentissage, la potentialisation à long terme est particulièrement utile pour comprendre comment l'efficacité synaptique peut être modifiée.

2.4.1 POTENTIALISATION À LONG-TERME

La potentialisation à long terme (PLT) est une modification à long-terme de l'efficacité d'une synapse induite par sa propre activité. La PLT est un mécanisme de plasticité qui est considéré comme la base moléculaire de la mémoire puisqu'il s'agit d'une forme de rétention d'information à la synapse (Lynch, 2004). Déjà en 1899 Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal et Fernández Santarén, 2006) avait émis l'hypothèse que l'information pourrait être entreposée dans des changements au niveau des connexions entre les neurones. Cette idée avait ensuite été reprise par Hebb (Hebb, 1949, 2002) qui avait proposé que si deux neurones sont actifs en même temps, l'efficacité de leurs connexions synaptiques est augmentée. Ce n'est cependant qu'entre 1966 et 1973 que Bliss et Lømo font la démonstration qu'un épisode d'activité intense comme une stimulation à haute fréquence augmente l'efficacité de la connexion entre deux neurones (Bliss et Lømo, 1973; Bliss et Collingridge, 1993). Ces premières démonstrations furent réalisées aux synapses entre la voie perforante et les cellules granulaires du gyrus dentelé (Bliss et Lømo, 1973). La PLT fut ensuite observée à chacune des synapses excitatrices du circuit principal de l'hippocampe (Schwartzkroin et Wester, 1975; Alger et Teyler, 1976) et aux synapses contactant les interneurons (Buzsaki et Eidelberg, 1982; Taube et Schwartzkroin, 1987; Ouardouz et Lacaille, 1995).

La PLT possède deux phases distinctes. La phase initiale (ou *early phase*) de la PLT ne requiert pas la synthèse de protéines mais des changements post transcriptionnels et a une durée de moins de trois heures (Lynch, 2004). Une deuxième phase tardive (ou *late phase*) de la PLT dure au moins trois heures et nécessite la synthèse de protéines (Krug et al., 1984).

2.4.1.1 RELATION ENTRE LA PLT ET LA MÉMOIRE

Plusieurs caractéristiques de la PLT font qu'elle est considérée comme un modèle cellulaire expérimental de la mémoire. Tout d'abord, la PLT et la mémoire sont associées à des synapses spécifiques suggérant que l'information puisse être localisée indépendamment à chacune des synapses du neurone, augmentant ainsi la capacité de stockage de la mémoire (Bliss et Collingridge, 1993). Ensuite, comme la mémoire, la PLT peut être associative, suggérant qu'une synapse est potentialisée que si elle est activée simultanément à la dépolarisation de la cellule cible (Bliss et Collingridge, 1993) suggérant que la PLT établit des liens entre les informations à mémoriser. La PLT est durable (Abraham et al., 1995) expliquant ainsi la persistance de la mémoire (Bliss et Collingridge, 1993). De plus, la PLT est présente dans l'hippocampe, une région importante pour la formation de la mémoire (Lynch, 2004). Aussi, l'activité en bouffées rythmiques à haute fréquence qui induit la PLT mime le rythme *thêta* qui survient naturellement dans l'hippocampe pendant l'activité exploratoire (Greenstein et al., 1988). Les mécanismes d'induction de la PLT et de la mémoire sont communs puisque l'inhibition de la PLT bloque aussi certaines formes de mémoire (Morris et al., 1986; Lynch, 2004). Les changements biochimiques qui ont lieu pendant la PLT surviennent aussi lors de l'acquisition de la mémoire (Lynch, 2004). Finalement, la mémoire à court terme et la phase rapide de la PLT ne nécessitent pas la synthèse de protéines tandis que la mémoire à long terme et la phase tardive de la PLT nécessitent l'activation de gènes et la synthèse de nouvelles protéines (Frey et al., 1993).

2.4.1.2 LES MÉCANISMES QUI SOUTIENNENT LA PLT

Les différentes synapses de l'hippocampe possèdent deux formes distinctes de PLT (Nicoll et Malenka, 1995; Bennett, 2000). La première a lieu aux synapses entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de la région CA3 qui expriment une forme de PLT non associative et indépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Nicoll et Malenka, 1995; Bennett, 2000). Nous nous

attarderons ici à la deuxième forme de PLT qui a lieu aux synapses entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de la région CA1. Cette forme de PLT est associative et nécessite l'activation des récepteurs NMDA (Lynch, 2004) (Figure 15). Aussi, la PLT est bloquée par les antagonistes des récepteurs NMDA : l'AP5 et le MK801 (Collingridge et al., 1983). Le récepteur NMDA s'ouvre lorsqu'il y a coïncidence de la libération de glutamate et de la dépolarisation postsynaptique (afin de lever l'obstruction par le Mg^{2+}) (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984) expliquant que l'induction de la PLT nécessite l'activité présynaptique coïncidente avec la dépolarisation du neurone postsynaptique (Wigstrom et Gustafsson, 1985; Lynch, 2004). Effectivement, l'activation des récepteurs NMDA seuls n'induit pas la PLT (Kauer et al., 1988) ce qui suggère que l'activité présynaptique coïncidente est aussi nécessaire à l'induction de la PLT.

Cette caractéristique des récepteurs NMDA (activité pré et postsynaptiques coïncidentes) confère donc à la PLT les propriétés d'associativité. L'associativité dans la PLT répond au postulat central de la théorie de Hebb où la modification de l'efficacité de la connexion entre deux neurones est due à l'association coïncidente de leur activité (Hebb, 1949, 2002).

L'étape critique, nécessaire et suffisante pour l'induction de la PLT est l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique (Figure 15) (Lynch, 2004). Les principales évidences de la dépendance au Ca^{2+} postsynaptique sont que la PLT est bloquée par des chélateurs de Ca^{2+} comme l'EGTA (Lynch et al., 1983) et le BAPTA (Mulkey et Malenka, 1992). À l'inverse, une augmentation "artificielle" de Ca^{2+} postsynaptique génère la PLT (Malenka et al., 1988). L'influx de calcium active plusieurs cascades de kinases sensibles au calcium dont la Ca^{2+} /calmoduline kinase II (CaMKII) (Figure 15) (Lledo et al., 1995), la protéine kinase A (PKA) (Yasuda et al., 2003), la protéine kinase C (PKC) (Malinow et al., 1989), les MAP (*mitogen activated protein*) kinase, la tyrosine kinase et la PI_3 kinase (Malenka et

Bear, 2004). L'inhibition de l'activité de la CaMKII ou de la PKC bloque aussi l'induction de la PLT (Malinow et al., 1989). Même si le mécanisme détaillé demeure encore controversé, il semble que le mécanisme général de la phase précoce de la PLT est le suivant : l'entrée de calcium active la Ca^{2+} calmoduline qui à son tour active la CaMKII, la PKC et les tyrosines kinase A et B (Lynch, 2004). L'activation de ces kinases modifie les propriétés et la densité des récepteurs AMPA responsables de la transmission synaptique (Figure 15) (Bliss et Collingridge, 1993). Premièrement, en phosphorylant les récepteurs AMPA, la CaMKII augmente leur sensibilité et leur conductance (Isaac et al., 1995). Deuxièmement, l'induction de la PLT est due en partie à l'insertion de récepteurs AMPA à la membrane des synapses (Figure 15) (Isaac et al., 1995). En ayant un plus grand nombre de récepteurs, il y a augmentation de la réponse du neurone post-synaptiques au glutamate libéré à la synapse (Isaac et al., 1995).

Certaines synapses possèdent des récepteurs NMDA mais sont fonctionnellement silencieuses parce que dépourvues de récepteurs AMPA (Isaac et al., 1995). Lorsque le neurone postsynaptique est hyperpolarisé, ces synapses silencieuses ne sont pas activées par la libération de glutamate. Ce n'est qu'après l'insertion de récepteurs AMPA suite à l'induction de la PLT que ces synapses silencieuses augmentent leur capacité de réponse et leur sensibilité à la transmission synaptique (Isaac et al., 1995).

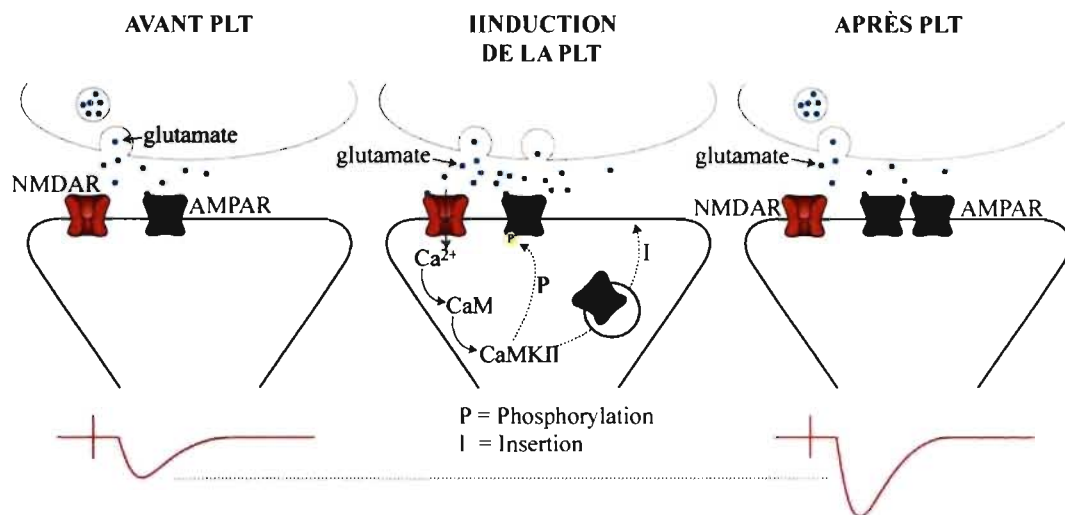


Figure 15. Mécanismes d'induction de la PLT.

Avant l'induction de la PLT (gauche), la relâche de glutamate active les récepteurs AMPA et produit la réponse postsynaptique (trace rouge). L'induction de la PLT (centre) produit une entrée de Ca^{2+} par les récepteurs NMDA qui active une cascade moléculaire causant la phosphorylation des récepteurs AMPA à la membrane et l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA. Après l'induction de la PLT (droite), la synapse possède plus de récepteurs AMPA produisant une réponse postsynaptique plus grande (trace rouge). Adapté de (Andersen, 2007).

Des changements présynaptiques, comme une augmentation de la quantité de neurotransmetteurs libérés, peuvent aussi être impliqués dans la PLT (Bliss et Collingridge, 1993). Les effets présynaptiques de la PLT semblent impliquer une forme de communication rétrograde du neurone postsynaptique vers la terminaison présynaptique (Lynch, 2004). Deux molécules semblent être des messagers rétrogrades potentiels : l'acide arachidonique et l'oxyde nitrique. Premièrement, la production d'acide arachidonique est augmentée pendant la PLT (Bliss et Collingridge, 1993) alors que l'inhibition de la synthèse de l'acide arachidonique peut bloquer l'induction de la PLT (Okada et al., 1989; Williams et al., 1989). De plus, l'acide arachidonique agit présynaptiquement en augmentant la libération de glutamate (Williams et al., 1989). Deuxièmement, l'oxyde nitrique est un autre candidat potentiel de messager rétrograde (Lynch, 2004). Effectivement, une des conséquences de l'augmentation de calcium dans le neurone postsynaptique est

l'activation de la synthase d'oxyde nitrique. L'oxyde nitrique ainsi produit diffuse du compartiment postsynaptique vers la terminaison présynaptique où, via la stimulation de la guanylate cyclase, il augmente la libération de glutamate (Holscher, 1997). Malgré la diffusion non spécifique de ces messagers rétrogrades, la PLT demeure un phénomène purement homosynaptique qui se développe uniquement aux synapses stimulées (Lynch, 2004).

Les travaux de Frey et Morris (Frey et Morris, 1997) ont démontré qu'il est possible pour une synapse de capturer la PLT induite ailleurs dans le neurone à condition que cette synapse soit suffisamment activée pour être "étiquetée" (Frey et Morris, 1997). Cette étiquette (ou *tag*) de courte durée permet de capturer les protéines nécessaires à la stabilisation de la phase tardive de la PLT (Frey et Morris, 1997).

2.4.2 DÉPRESSION À LONG-TERME

La plasticité synaptique dans l'hippocampe peut aussi réduire l'efficacité synaptique. La dépression à long-terme (DLT) est une diminution soutenue de l'efficacité synaptique qui est induite dans l'hippocampe suite à certains types de stimulation électrique (Bear et Abraham, 1996). Dans la région CA1 de l'hippocampe, on distingue deux types de DLT. La DLT homosynaptique a lieu aux synapses qui sont stimulées à basse fréquence (Mulkey et Malenka, 1992). Il existe peu d'information sur la DLT hétérosynaptique et il semble que cette forme de DLT soit uniquement induite lorsque l'inhibition est réduite et les canaux calciques activés (Abraham et Wickens, 1991; Wickens et Abraham, 1991).

La DLT homosynaptique est spécifique aux synapses qui ont été stimulées et son induction dépend de la fréquence de stimulation. La DLT homosynaptique résulte de la stimulation à basse fréquence entre 0.5 et 3 Hz (Dudek et Bear, 1992). La stimulation à basse fréquence répétée peut saturer la DLT mais cette situation peut

être renversée par la potentialisation de la synapse suggérant que la DLT n'est pas un phénomène irréversible (Mulkey et Malenka, 1992).

Deux formes de DLT homosynaptique sont différenciées par leur mécanisme. Une première forme de DLT est dépendante des récepteurs mGluR (Tan et al., 2003). Il semble que l'activation de récepteurs mGluR du groupe I induise cette forme de DLT dans la région CA1 en modifiant la signalisation calcique présynaptique, ce qui inhibe la libération de neurotransmetteur (Watabe et al., 2002; Tan et al., 2003). Une deuxième forme de DLT nécessite l'activation des récepteurs NMDA post synaptiques et l'entrée subséquente de calcium (Bear et Abraham, 1996). Il peut paraître étrange que ces deux étapes (NMDA et calcium) soient aussi communes avec la PLT. Il semble que l'entrée de calcium contrôle le seuil entre l'induction de la DLT ou de la PLT. Ainsi, en dessous d'un certain seuil d'entrée de calcium la DLT est induite mais au dessus de celui-ci il en résulte la PLT (Dudek et Bear, 1992). La DLT dépendante des récepteurs NMDA est principalement due à la réduction du nombre de récepteurs postsynaptiques (Bear et Abraham, 1996).

2.4.3 DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE

La dépression hétérosynaptique est un mécanisme de plasticité qui est présent aux synapses des collatérales de Schaffer ou de la voie commissurale et qui est induit en parallèle de la PLT (Lynch et al., 1977). Les synapses non stimulées lors de l'induction de la PLT sont modifiées par cette dépression hétérosynaptique (Lynch et al., 1977).

Plusieurs rôles ont été suggérés pour la dépression hétérosynaptique dans l'hippocampe (Dunwiddie et Lynch, 1978). La dépression hétérosynaptique pourrait maintenir une symétrie dans les "poids" synaptiques. En déprimant une synapse pendant la potentialisation d'une autre, l'efficacité synaptique totale est maintenue constante. La dépression hétérosynaptique pourrait aussi prévenir la saturation des synapses par la PLT. En évitant que les synapses soient saturées, la

dépression hétérosynaptique maintient le caractère plastique du réseau. La dépression hétérosynaptique pourrait réduire le bruit synaptique aux synapses non stimulées et ainsi augmenter le contraste entre l'activité des synapses potentialisées et des synapses non stimulées.

La dépression hétérosynaptique est bloquée par les antagonistes des récepteurs NMDA (Dunwiddie et Lynch, 1978; Bashir et Collingridge, 1992; Manzoni et al., 1994), par les antagonistes des récepteurs A_1 à l'adénosine (Manzoni et al., 1994) et par l'enképhaline qui inhibe spécifiquement les interneurones (Manzoni et al., 1994). De plus, la dépression hétérosynaptique est un phénomène purement présynaptique (Manzoni et al., 1994) dont l'induction dépend de la fréquence de stimulation des afférences excitatrices (Lynch et al., 1977; Dunwiddie et Lynch, 1978). Le mécanisme suivant a été proposé pour expliquer la dépression hétérosynaptique (Manzoni et al., 1994) (Figure 16) : La stimulation à haute fréquence cause une libération de glutamate activant les interneurones GABAergiques par les récepteurs NMDA. Ces interneurones produiraient indirectement une augmentation d'adénosine qui induit la dépression présynaptique des synapses excitatrices via l'activation de récepteurs A_1 (Manzoni et al., 1994).

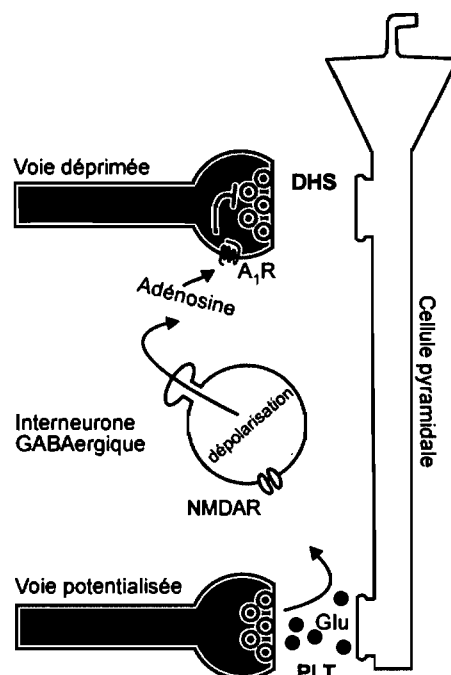


Figure 16. Schéma du mécanisme de la dépression hétérosynaptique selon Manzoni et al., (1994).

La voie potentialisée des collatérales de Schaffer libère du glutamate qui active les interneurones par les récepteurs NMDA. Les interneurones libèrent de l'adénosine qui active les récepteurs A₁ responsables de l'inhibition de la transmission synaptique à la voie déprimée des collatérales de Schaffer.

Le traitement, l'intégration et l'entreposage d'information ont ainsi longtemps été les fonctions propres aux neurones. C'est donc du point de vue neuronal qu'a été étudiée principalement la transmission et la plasticité synaptiques. Les autres cellules du système nerveux central et en particulier les astrocytes ont longtemps été considérés que comme des cellules de soutien. Au cours des dix dernières années, plusieurs données expérimentales ont démontré que les astrocytes sont en relation physique très étroite avec les synapses et qu'ils participent aux mécanismes de transmission synaptique (Auld et Robitaille, 2003). La section suivante introduit les cellules gliales et leur rôle dans les fonctions synaptiques.

2.5 CELLULES GLIALES

2.5.1 DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES GLIALES

Les cellules gliales sont présentes dans tout le système nerveux et forment une population cellulaire diversifiée avec deux familles majeures : les cellules microgliales et les cellules macrogliales. On identifie trois types de cellules macrogliales : les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et les astrocytes (Halassa et al., 2007b). Les cellules de Bergmann sont généralement considérées comme les astrocytes du cervelet et ne seront pas abordées dans cette description (Grosche et al., 1999).

2.5.1.1 LES CELLULES MICROGLIALES

Les cellules microgliales sont des macrophages spécialisés dérivés de précurseurs hématopoïétiques (Cuadros et al., 1992). Comme leur nom l'indique, ces cellules possèdent une très petite taille mais une morphologie étoilée sans polarité apparente avec une arborisation de prolongements membranaires complexe (Kettenmann et Ransom, 2005). Certaines cellules microgliales semblent avoir un rôle dans la réponse et la protection immunitaire du système nerveux central. De plus, la capacité de déplacement et de phagocytose des cellules microgliales leur permettent de se diriger vers les sites lésés du tissu pour nettoyer les débris (Kettenmann et Ransom, 2005). Les cellules microgliales ont la capacité de se diviser par mitose même chez l'adulte (Kettenmann et Ransom, 2005). Finalement, des données récentes montrent que les cellules microgliales jouent aussi un rôle modulateur à la synapse par une interaction avec les astrocytes et les éléments neuronaux (Beattie et al., 2002; Schipke et al., 2002; Stellwagen et Malenka, 2006).

2.5.1.2 LES OLIGODENDROCYTES

Dans le système nerveux central, la membrane des oligodendrocytes s'enroule autour des axones du système nerveux central et produit l'enveloppe de myéline isolante permettant la propagation saltatoire des potentiels d'actions (Kettenmann

et Ransom, 2005). La dysfonction des oligodendrocytes et de la myéline est associée à des états pathologiques comme la sclérose (Halassa et al., 2007b). Les cellules de Schwann sont l'équivalent des oligodendrocytes dans le système nerveux périphérique.

2.5.1.3 LES ASTROCYTES

Les astrocytes sont probablement le type de cellules gliales le plus abondant dans le système nerveux central. Leurs morphologie varie selon la région du système nerveux et la fonction de l'astrocyte (Figure 17). Dans l'hippocampe, les astrocytes possèdent des prolongements membranaires qui s'étendent du corps cellulaire et qui leur donnent une morphologie étoilée. On peut définir deux types de prolongements de la membrane astrocytaire. Les prolongements primaires prennent origine du corps cellulaire et contiennent les organelles et le cytosquelette (Peters et al., 1991). Les prolongements secondaires, plus fins, prennent origine d'un prolongement primaire et sont dépourvus d'organelles ou d'éléments cytosquelettiques (Peters et al., 1991). Il est intéressant de noter que les surfaces occupées par l'arborisation d'astrocytes contigus ne se chevauchent pas, indiquant que chaque astrocyte occupe un espace indépendant (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007a).

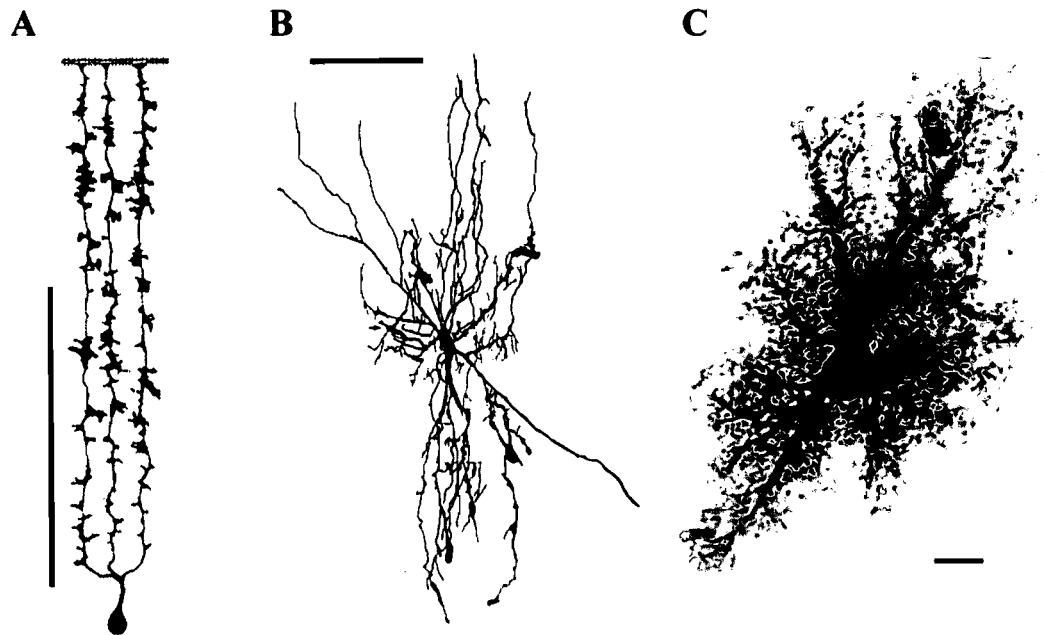


Figure 17. Morphologie de trois types d'astrocytes du système nerveux central.

A) Astrocyte radial tiré de Kettenmann et Ransom (2005). B) Astrocyte fibreux tiré de Kettenmann et Ransom (2005). C) Astrocyte protoplasmique tiré de Bushong et al. (2002).

2.5.1.3.1 Différenciation des populations d'astrocytes de l'hippocampe

Plusieurs méthodes permettent de visualiser la morphologie, d'identifier les populations d'astrocytes et de distinguer différentes types cellulaires des autres cellules du réseau.

2.5.1.3.1.1 Identification immunocytochimique

Puisque plusieurs protéines sont exprimées exclusivement par les astrocytes, le marquage histochimique de ces protéines permet l'identification spécifique de ces cellules. Les astrocytes sont généralement identifiés par les principales protéines suivantes (liste non complète) : GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), la vimentine, la nestine, la synthétase de glutamine, la protéine S-100b et la R-cadhérine (Kettenmann et Ransom, 2005). Par contre, le marquage immunocytochimique possède certaines limites. Certaines protéines ne sont pas distribuées uniformément dans l'astrocyte (Bushong et al., 2002). La GFAP, une

protéine du cytosquelette des prolongements primaires, est absente des prolongements secondaires (Figure 18) (Bushong et al., 2002). Or, ces prolongements secondaires représentent 50% du volume cellulaire mais comptent pour 80% de la surface membranaire (Chao et al., 2002). Le marquage de la GFAP n'est donc pas un bon outil pour visualiser des interactions entre prolongements astrocytaires de cellules adjacentes ou entre astrocytes et neurones (Figure 18). Une autre limite de l'identification immunocytochimique est l'absence de la protéine astrocytaire GFAP chez une sous population d'astrocytes de l'hippocampe (Walz et Lang, 1998). Cette limite peut ainsi mener à sous-estimer le nombre d'astrocytes dans le réseau. Cependant, le laboratoire de Mark Ellisman n'a pu répliquer cette observation et soutient le contraire (Bushong et al., 2002).

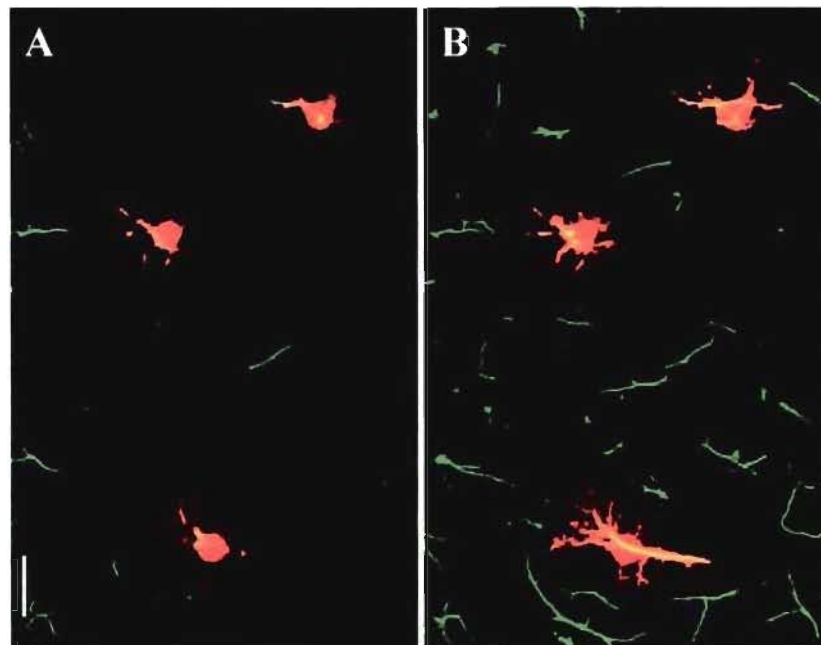


Figure 18. Identification d'astrocytes dans la couche *radiatum* de la région CA1.

A) Une couche optique montre le co-marquage du cytosquelette astrocytaire (GFAP), en vert, et le volume de trois astrocytes, injectés d'un fluorophore rouge. B) La projection de plusieurs couches optiques totalisant une épaisseur de 25 μm montre le faible volume occupé par le cytosquelette (représenté en jaune) ainsi que l'absence de chevauchement entre astrocytes adjacents. Tiré de (Bushong et al., 2002).

2.5.1.3.1.2 Identification à l'aide d'un transgène

Il existe aujourd'hui des souris transgéniques qui expriment une protéine fluorescente verte (GFP pour *green fluorescent protein*) dans les astrocytes (Zhuo et al., 1997). Le gène de la GFP, isolé d'une méduse bioluminescente, produit une protéine fluorescente. Lorsque ce gène est introduit dans des souris sous le contrôle du promoteur de la GFAP, une protéine exprimée sélectivement dans les astrocytes, il en résulte des astrocytes fluorescents dans le tissu. Cette fluorescence est utilisée pour visualiser, distinguer et identifier les astrocytes dans un réseau. Cette technique ne présente pas les limitations de l'identification immunocytochimique de la GFAP à condition que la GFP puisse diffuser librement dans le cytoplasme astrocytaire et qu'elle ne soit pas liée à la GFAP.

2.5.1.3.1.3 Identification avec des molécules marqueurs

Il est aussi possible de tirer avantage de la capacité des astrocytes à accumuler des molécules "marqueurs" comme des senseurs calciques fluorescents estérifiés (Kettenmann et Ransom, 2005). Selon leur utilisation, ces marqueurs fluorescents (comme le Fluo4-AM) sont préférentiellement accumulés dans les astrocytes. En visualisant la fluorescence produite par ces molécules, une fois accumulées dans les astrocytes, il est possible d'identifier ces cellules dans un réseau (Kettenmann et Ransom, 2005).

2.5.1.3.1.4 Identification biophysique

Une autre façon de différencier les astrocytes de l'hippocampe est d'étudier leurs propriétés biophysiques. Ce type d'analyse a permis de distinguer deux types d'astrocytes : les cellules passives, linéaires ou GluT nommées ainsi parce qu'ils possèdent des transporteurs au glutamate et les cellules rectifiantes ou GluR nommées ainsi parce qu'ils possèdent des récepteurs au glutamate (Bordey et Sontheimer, 1997; McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003; Blomstrand et al., 2004; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). Il semble que les astrocytes rectifiants ou GluR possèdent les mêmes caractéristiques que les "cellules précurseurs d'oligodendrocytes"

(OPC) et les cellules exprimant la protéoglycan2 (NG2⁺) suggérant qu'il s'agit, en fait, de la même population d'astrocytes (Matthias et al., 2003; Zhou et al., 2006). Parfois certains laboratoires identifient un troisième groupe de cellules, complexes ou à rectification variable (McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et Kimelberg, 2001; Zhou et al., 2006). Cinq principales caractéristiques semblent différencier ces types d'astrocytes entre eux.

Premièrement, l'expression différentielle de certains gènes. Les deux principaux sous types d'astrocytes ont une expression différentielle mutuellement exclusive de certaines protéines. Les astrocytes GluR expriment les sous-unités GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4 des récepteurs AMPA au glutamate et possèdent des courants induits par des récepteurs AMPA fonctionnels (Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003). Les astrocytes GluT sont dépourvus de toutes les sous-unités GluR des récepteurs AMPA, mais possèdent des transporteurs GLAST et GLT-1 sensibles au glutamate (Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003). Il faut noter que les astrocytes GluR possèdent aussi des transporteurs EAAC1, GLAST et GLT-1 mais ceux-ci semblent insensibles au glutamate (Seifert et Steinhauser, 1995; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003).

Deuxièmement, la relation courant voltage des astrocytes. Lorsque la technique de patch-clamp en voltage imposé est utilisée pour enregistrer les astrocytes il est possible d'obtenir la courbe courant/voltage (I/V) de leur membrane. Il s'agit du courant mesuré à travers la membrane à plusieurs potentiels imposés. Puisque différents types d'astrocytes possèdent des conductances ioniques distinctes qui se reflètent sur les propriétés de la membrane, la courbe I/V devient une caractéristique particulière de chaque type d'astrocyte. Deux types principaux de courbes I/V d'astrocytes ont été identifiés : une courbe linéaire, passive ou ohmique et une courbe avec une rectification sortante (Bordey et Sontheimer, 1997; McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003; Blomstrand et al., 2004; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). Certains laboratoires ont identifié un troisième type de cellules,

intermédiaire, complexe ou à rectification variable (McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et Kimelberg, 2001; Zhou et al., 2006).

Troisièmement, le potentiel membranaire de repos des astrocytes. En utilisant la technique de patch-clamp, plusieurs laboratoires ont identifié que le potentiel membranaire de repos des astrocytes GluT (de -69 mV à -82 mV) est, en général, plus hyperpolarisé que celui des astrocytes GluR (de -31 mV à -70 mV) (McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003; Zhou et al., 2006). Par contre, ces données révèlent aussi que le potentiel membranaire de repos des astrocytes de même sous type (GluT ou GluR) n'est pas uniforme et semble dévoiler la présence de deux autres sous-groupes cellulaires distincts à l'intérieur même de ces grandes classes d'astrocytes GluT ou GluR (McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998).

Quatrièmement, la résistance membranaire des astrocytes. Encore une fois en utilisant la technique de patch-clamp, plusieurs laboratoires ont identifié que la résistance membranaire des astrocytes GluT (de 6 M Ω à 195 M Ω) est, en général, plus petite que celle des astrocytes GluR (de 88 M Ω à 1500 M Ω) (McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003; Blomstrand et al., 2004; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006).

Cinquièmement, le couplage intercellulaire. Le couplage entre les astrocytes peut être quantifié en utilisant la technique de patch-clamp afin d'injecter un marqueur diffusible pour visualiser le nombre de cellules connectées (McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Blomstrand et al., 2004; Wallraff et al., 2004). Il a été rapporté que les astrocytes de type GluT sont fortement couplés et ce particulièrement dans la couche radiatum de la région CA1 de l'hippocampe (McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Wallraff et al., 2004). Les astrocytes de type GluR, par contre, ne sont pas couplés (Wallraff et al., 2004).

Il existe donc de nombreux types de cellules gliales mais aussi différents types d'astrocytes jouant des rôles variés dans le système nerveux central et en

particulier dans l'hippocampe. Dans la section suivante nous aborderons les rôles joués par les astrocytes.

2.5.2 RÔLES DES ASTROCYTES DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

En examinant les rôles joués par les astrocytes dans le fonctionnement du système nerveux central on comprend vite qu'il s'agit de cellules pluripotentes d'une complexité étonnante.

2.5.2.1 LES ASTROCYTES : CELLULES DE SOUTIEN

Initialement perçus comme la "colle" qui soutiens la structure du réseau neuronal, les astrocytes ont longtemps été considérés comme des cellules de support qui remplissent l'espace interstitiel entre les neurones (Volterra et Meldolesi, 2005).

2.5.2.2 RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT

Les astrocytes guident aussi la migration neuronale lors du développement. Les astrocytes radiaux jouent ce rôle de support crucial pendant le développement formant littéralement les piliers sur lesquels migrent les neurones vers leur couches respectives (Figure 17) (Miller et Liuzzi, 1986). Dans le cervelet des mammifères, les astrocytes radiaux sont les cellules gliales de Bergmann (Reichenbach et al., 1995).

2.5.2.3 LES ASTROCYTES ET LA NEUROGENÈSE

Les astrocytes semblent jouer un rôle lors de la neurogenèse chez l'adulte. Il semble que les précurseurs neuronaux possèdent plusieurs caractéristiques communes avec les astrocytes. Dans l'hippocampe, ces précurseurs neuronaux commencent leur différenciation dans le gyrus dentelé puis migrent vers d'autres régions où ils semblent intégrer le circuit neuronal (Seri et al., 2001).

2.5.2.4 RÔLE DANS LA SYNAPTOGENÈSE, LA SURVIE ET LE DÉVELOPPEMENT NEURONAL

Il est intéressant de noter que la présence d'astrocyte est nécessaire à la synaptogenèse. Par exemple, la présence d'astrocytes dans une culture de neurones

augmente le nombre de synapses fonctionnelles (Pfrieger et Barres, 1997; Ullian et al., 2004). Cet effet serait causé, en partie, par un dérivé du cholestérol libéré par les cellules gliales (Mauch et al., 2001). La survie et le développement des neurones dépendent également de facteurs trophiques libérés par les astrocytes (Beattie et al., 2002).

2.5.2.5 RÔLE DANS LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE ET DU GLYCOGÈNE

Les astrocytes sont à la base du métabolisme du glucose et du glycogène. Les réserves énergétiques, sous formes de glycogène, seraient contenues principalement dans les astrocytes qui, au besoin, les dégradent en glucose transféré aux neurones (Pellerin et Magistretti, 1994; Hertz et al., 1999).

2.5.2.6 LES ASTROCYTES ET LE MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE IONIQUE EXTRACELLULAIRE

Les astrocytes jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie ionique extracellulaire. Par exemple, en contrôlant la concentration extracellulaire de potassium, les astrocytes protoplasmiques (Figure 17) influencent directement l'excitabilité membranaire des neurones (Walz, 2000; Wallraff et al., 2006).

2.5.2.7 LES ASTROCYTES, LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE ET LE CONTRÔLE DE LA MICROCIRCULATION

Les astrocytes isolent les vaisseaux sanguins en formant la barrière hémato-encéphalique avec les cellules endothéliales et contrôlent la microcirculation sanguine dans le cerveau. Les membranes d'astrocytes en apposition étroite tapissent la surface des vaisseaux sanguins et limitent ainsi la communication avec le tissu du système nerveux central (Simard et Nedergaard, 2004). Les astrocytes peuvent aussi contracter et dilater les vaisseaux sanguins et contrôler ainsi le débit de la microcirculation (Zonta et al., 2003; Mulligan et MacVicar, 2004; Haydon et Carmignoto, 2006).

2.5.2.8 RÔLES DES ASTROCYTES DANS LE FONCTIONNEMENT DE LA SYNAPSE

Dans les dix dernières années il a été démontré que les astrocytes jouent un rôle actif dans le fonctionnement de la synapse en isolant la fente synaptique en un espace plus étanche, en s'occupant de la recapture des neurotransmetteurs libérés qui autrement pourraient être toxiques ou causer une communication croisée, en modulant la transmission synaptique et, finalement, en participant à la plasticité synaptique (Todd et al., 2006).

Les sections suivantes présentent les évidences montrant premièrement que les astrocytes sont idéalement positionnés au niveau de la fente synaptique, deuxièmement que les astrocytes sont des cellules excitables, troisièmement que les astrocytes sont activés par l'activité synaptique et quatrièmement que les astrocytes modulent en retour l'activité synaptique.

2.5.2.8.1 Les astrocytes contactent la synapse

L'organisation anatomique des astrocytes est aussi fonction du réseau neuronal. Par exemple, les astrocytes présents dans la matière blanche, dépourvue de synapses, possèdent peu de prolongement et ceux-ci sont dirigés vers les nœuds de Ranvier (Butt et al., 1994). Il est intéressant de noter que dans une structure qui possède beaucoup de synapses comme la région CA1 de l'hippocampe, les prolongements astrocytaires sont dirigés vers les synapses (Ventura et Harris, 1999). Effectivement, l'analyse de l'organisation anatomique des synapses démontre que 57% des synapses de la couche *stratum radiatum* sont en contact avec un astrocyte (Figure 19) (Ventura et Harris, 1999). Ces observations suggèrent donc que les prolongements astrocytaires sont apposés aux synapses et donc en contact étroit avec les sites de libération de neurotransmetteurs.

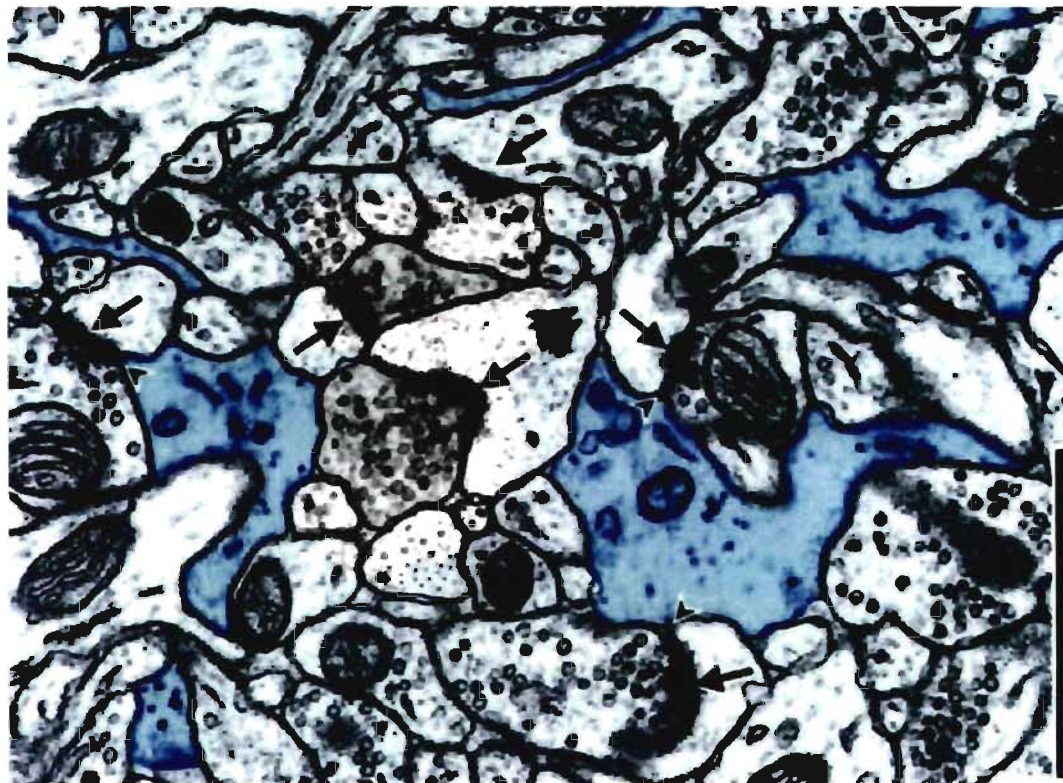


Figure 19. Organisation ultrastructurale des cellules gliales de la synapse.

Coupe en microscopie électronique montrant que l'organisation synaptique dans la couche *radiatum* de la région CA1 de l'hippocampe possède trois éléments : le bouton présynaptique, l'épine postsynaptique et l'élément astrocytaire. Les flèches indiquent les synapses où l'on peut distinguer l'élément présynaptique, rempli de vésicules synaptiques, et la densité postsynaptique. Les astrocytes sont indiqués en bleu. Tiré de (Ventura et Harris, 1999).

La présence des astrocytes à la synapse permettrait, entre autres rôles, de limiter la diffusion du neurotransmetteur en périphérie de la densité postsynaptique. En enveloppant les synapses, les astrocytes évitent les effets toxiques causés par un excès de glutamate (Choi, 1988; Rosenberg et Aizenman, 1989; Rosenberg et al., 1992; Mennerick et al., 1996; Rothstein et al., 1996; Porter et McCarthy, 1997) et assurent la fidélité de la transmission synaptique sans causer de communication croisée entre synapses adjacentes, des conditions essentielles au transfert d'information efficace dans le système nerveux (Oliet et al., 2001; Piet et al., 2004). Dans ce contexte il est curieux que seulement 57% des synapses de la

couche *stratum radiatum* soient en contact avec un prolongement astrocytaire (Ventura et Harris, 1999). La distribution hétérogène des astrocytes suggère qu'ils contactent préférentiellement certains types de synapses. Puisque les prolongements des astrocytes se dirigent vers les sites de libération de neurotransmetteurs (Hatten, 1985; Cornell-Bell et al., 1990; Matsutani et Yamamoto, 1997) mais que la quantité de neurotransmetteur libéré varie d'une synapse à l'autre (Hessler et al., 1993; Murphy et Segal, 1997; Liu et al., 1999; Ma et al., 1999) il est possible que les astrocytes ne contactent que les synapses plus actives. Ainsi, les synapses peu actives ou silencieuses (Ma et al., 1999) ne seraient pas associées à un astrocyte. Il est intéressant de noter que le contact entre les prolongements astrocytaires et la synapse est dynamique et qu'il est modulé par l'activité neuronale. Une forte stimulation du réseau neuronal comme celle qui induit la PLT cause une réorganisation astrocytaire et une augmentation du nombre de synapses contactées par les prolongements d'astrocytes (Wenzel et al., 1991).

2.5.2.8.2 Les astrocytes sont des cellules excitables

Par définition, une cellule excitable est capable d'entrer en activité et de réagir sous l'action d'un agent externe ou interne (Hille, 2001). Parce que les astrocytes ne possèdent pas une concentration suffisante de canaux sodiques dépendant du voltage, la dépolarisation de leur membrane ne produit pas de potentiel d'actions. Cette propriété a fait que les astrocytes ont été considérés comme des cellules passives ou non excitables mais de nombreuses études ont démontré que les astrocytes encodent l'information différemment à l'aide d'un mécanisme particulier : la signalisation calcique (Auld et Robitaille, 2003).

Plusieurs études ont contribué à confirmer que la signalisation calcique est un mécanisme propre à l'activation des astrocytes et des cellules gliales. Les études initiales ont démontré que les astrocytes en culture stimulés mécaniquement montrent des élévations calciques (Charles et al., 1993; Araque et al., 1998b). Ce

mécanisme de signalisation particulier a ensuite été observé suite à l'application d'agonistes ou suite à la stimulation électrique (Cornell-Bell et al., 1990; Dani et al., 1992; Porter et McCarthy, 1996). Finalement, la signalisation calcique est aussi observée dans les astrocytes de préparations intactes, comme des tranches d'hippocampe, ou encore *in vivo* (Porter et McCarthy, 1996; Mulligan et MacVicar, 2004).

La section suivante décrit comment la signalisation calcique est finement contrôlée par les astrocytes.

2.5.2.8.2.1 L'homéostasie calcique dans les astrocytes

La signalisation calcique dans les astrocytes est basée sur la différence entre la concentration très faible de calcium libre dans le cytoplasme (≈ 50 nM) et celle qui est dans les réserves internes de calcium ou dans le milieu extracellulaire (≈ 1 mM). Différentes voies permettent de créer des augmentations temporaires de calcium dans le cytoplasme des astrocytes. Ces différentes voies permettent d'augmenter ou diminuer le calcium cytosolique de sorte que la signalisation calcique est un phénomène hautement régulé par les astrocytes (Figure 20). Les canaux calciques dépendant du voltage permettent l'entrée de calcium du milieu extracellulaire mais chez les astrocytes ils semblent contribuer uniquement à la signalisation calcique dans des conditions pathologiques (Westenbroek et al., 1998). Dans des conditions très particulières (canaux K^+ bloqués et tranches traitées à l'AMPc), la membrane astrocytaire peut tout de même générer des potentiels d'action calciques (MacVicar, 1984). Les types de canaux calciques semblent varier selon la région et les conditions expérimentales. En général, il est accepté que les astrocytes en culture possèdent plusieurs canaux révélés par la sensibilité à différents antagonistes (Akopian et al., 1996) : des canaux de type L (MacVicar et Tse, 1988), de type N (Akopian et al., 1996) sensibles à la nimodipine, verapamil et ω -conotoxine et de type T (Barres et al., 1988, 1989) sensibles à l'amiloride (Akopian et al., 1996).

Les astrocytes possèdent aussi plusieurs récepteurs canaux perméables au calcium comme les récepteurs au glutamate (Figure 20) (Shelton et McCarthy, 1999). Ces récepteurs contribuent aussi à l'entrée de calcium et seront discutés en détail à la section suivante. Plusieurs récepteurs métabotropes couplés à la phospholipase C sont capables d'induire une libération de calcium à partir de réserves intracellulaires (Figure 20). Il semble que la libération de calcium des réserves internes (le réticulum endoplasmique) est une des voies principales de signalisation calcique dans les astrocytes. La phospholipase C est une enzyme qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol-bis-phosphate (PIP_2) en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) (Riedel et al., 2003). À son tour, l' IP_3 induit l'ouverture des récepteurs canaux sensibles à l' IP_3 sur le réticulum endoplasmique et produit une libération de calcium des réserves intracellulaires vers le cytoplasme. Les récepteurs à la ryanodine pourraient aussi libérer le calcium vers le cytoplasme mais cette voie semble être moins importante dans les astrocytes que dans les neurones (Kettenmann et Ransom, 2005).

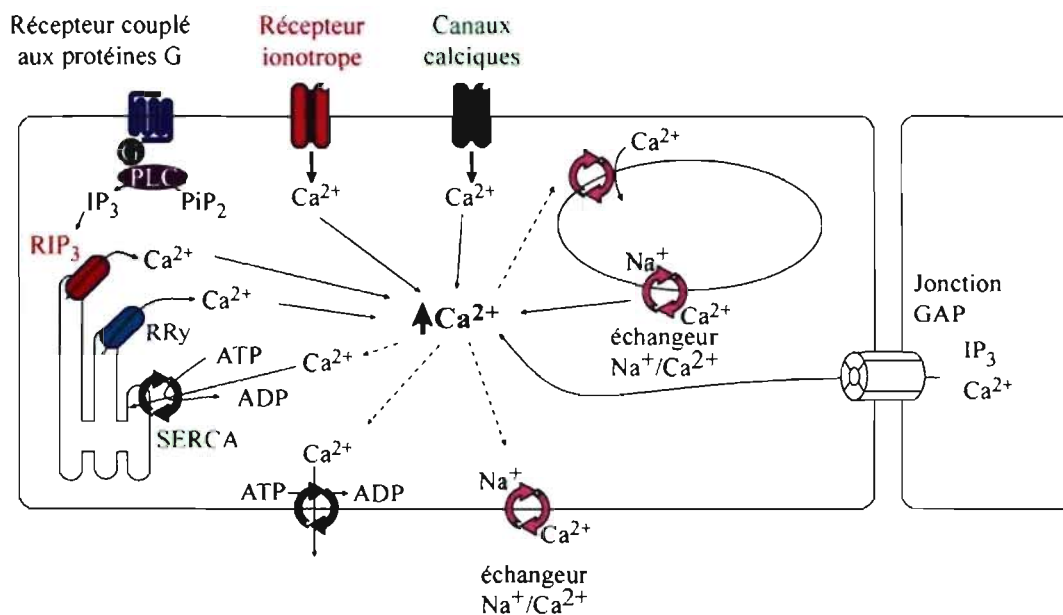


Figure 20. Schématisation des voies principales qui contrôlent le calcium cytosolique dans les astrocytes.

Les récepteurs ionotropes perméables au Ca²⁺, les canaux calciques, les récepteurs à l'IP₃ et à la ryanodine sur les réserves internes et les échangeurs de calcium sur les mitochondries contribuent à augmenter le calcium cytosolique. Les pompes membranaires et SERCA (*sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATP*) ainsi que les échangeurs membranaires et mitochondriaux contribuent à diminuer le calcium cytosolique. Les jonctions GAP peuvent augmenter ou diminuer le calcium cytosolique. Adapté de Kettenmann et Ransom (2005).

Le signal calcique initial peut aussi être amplifié. Ce mécanisme amplificateur est communément appelée la "réponse calcique induite par le calcium" et semble impliquer des canaux calciques opérés par les réserves calciques (ou *store operated calcium channels* SOCs). Peu de données sont disponibles sur ces canaux et leurs mécanismes dans les astrocytes de l'hippocampe, mais il semble que cette voie permette l'induction d'une entrée de calcium soutenue (Gilibert et Parekh, 2000).

Plusieurs voies permettent aussi de terminer la réponse calcique et abaisser la concentration de calcium libre cytoplasmique au niveau basal (Figure 20). Des échangeurs ou pompes calciques qui transportent le calcium vers le milieu

extracellulaire, vers le lumen du réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries et des protéines qui lient le calcium diminuent la calcium libre (Kettenmann et Ransom, 2005).

Les élévations calciques peuvent être d'une durée variable et dans certaines conditions peuvent se répéter pour générer des oscillations calciques. La fréquence et l'amplitude des réponses calciques astrocytaires permettraient l'encodage de l'information synaptique puis sa traduction en une réponse cellulaire. La réponse astrocytaire suite à l'excitation produite par l'élévation calcique est générée par des protéines sensibles au calcium. Différentes protéines effectrices semblent pouvoir être activées par le calcium dans les astrocytes. Premièrement, les astrocytes possèdent une famille de protéines SNARE (SNAP23, complexine2 et synaptotagmine IV mais pas SNAP25, synaptotagmine I ou synaptophysine) sensibles au calcium et à la toxine botulique qui forme la machinerie responsable de l'exocytose vésiculaire de gliotransmetteurs (Araque et al., 2000; Volterra et Meldolesi, 2005). Deuxièmement, les astrocytes possèdent aussi une série de protéines sensibles au calcium dont le rôle est lié à la phosphorylation d'autres protéines (Kettenmann et Ransom, 2005). Une troisième famille de protéines sensibles au calcium semble être capable de transférer le message au noyau cellulaire afin de moduler l'expression génétique et influencer à long terme la réponse cellulaire. Il semble que certaines de ces protéines senseurs de calcium comme la calmoduline ont la capacité d'intégrer les paramètres de la réponse calcique (Codazzi et al., 2001). Cette capacité d'intégration concède aux protéines sensibles au calcium la possibilité d'induire un large éventail de réponses cellulaires. Par exemple, la calmoduline interagit avec plusieurs enzymes telles la protéine kinase dépendante de la calmoduline, des phosphatases et l'adénylate cyclase (Ghosh et Greenberg, 1995). Ces dernières peuvent interagir avec des enzymes du cytoplasme ou transférer le signal au noyau et initier des voies de signalisation qui impliquent l'expression de gènes.

La section suivante décrit comment l'activité synaptique est capable d'exciter les astrocytes de l'hippocampe et d'induire la signalisation calcique.

2.5.2.8.3 Les astrocytes sont sensibles à l'activité synaptique

L'observation que les astrocytes sont sensibles à l'activité synaptique est probablement la découverte principale qui a déclenché l'intérêt pour le rôle des astrocytes dans la fonction synaptique. Dans l'hippocampe, la stimulation des neurones produit des courants membranaires ou des élévations calciques dans les astrocytes (Dani et al., 1992; Fraser et al., 1995; Seifert et Steinhauser, 1995; Verkhratsky et al., 1998). Les élévations calciques et l'activité électrique sont produites par l'action de différents neurotransmetteurs sur des récepteurs que l'on croyait auparavant spécifiques aux neurones. Les astrocytes expriment plusieurs types de récepteurs.

2.5.2.8.3.1 Récepteurs AMPA astrocytaires

L'activation de récepteurs AMPA/kainate par le glutamate induit des élévations calciques dans les astrocytes en culture et dans les tranches d'hippocampe *in situ* (Glaum et al., 1990; Burnashev et al., 1992; Muller et al., 1992; Holzwarth et al., 1994; Porter et McCarthy, 1995b; Seifert et Steinhauser, 1995; Shelton et McCarthy, 1999). Ces récepteurs AMPA/kainate contiennent les sous unités GluR1,2,3,4,6 mais pas GluR5 (Holzwarth et al., 1994). Il semble que les élévations calciques induites par l'activation des récepteurs AMPA/kainate soient principalement produites par l'entrée de calcium à travers le canal du récepteur puisque les bloqueurs des canaux calciques de type L n'affectent pas la réponse (Jabs et al., 1994).

2.5.2.8.3.2 Récepteurs mGluR

L'activation de récepteurs mGluR par le glutamate induit des élévations calciques dans les astrocytes (Holzwarth et al., 1994; Porter et McCarthy, 1995b, 1996; Shelton et McCarthy, 1999; Fellin et al., 2004). Ces réponses peuvent être générées par la stimulation des collatérales de Schaffer (50 Hz, 2 sec) (Porter et

McCarthy, 1996). Les récepteurs métabotropes du groupe I, II et III sont présents dans les astrocytes (Verkhatsky et al., 1998; Shelton et McCarthy, 1999; Fellin et al., 2004). En absence de calcium extracellulaire, l'élévation calcique produite par l'activation des récepteurs mGluR n'est pas bloquée, suggérant que le calcium provient des réserves de calcium intracellulaires (Ahmed et al., 1990; Verkhatsky et al., 1998). Il semble que les réserves calciques régulées par les récepteurs à l'IP₃ jouent un rôle particulier dans les réponses calciques induites par les récepteurs mGluR dans les astrocytes (Verkhatsky et al., 1998). L'expression de différents récepteurs mGluR augmente les possibilités de signalisation calcique puisque certains récepteurs contribuent préférentiellement à des réponses oscillatoires tandis que d'autres produisent plutôt des réponses monophasiques (Kawabata et al., 1996).

2.5.2.8.3.3 Récepteurs NMDA

Dans le cortex, les astrocytes possèdent des récepteurs NMDA fonctionnels (Schipke et al., 2001). Il semble que les récepteurs NMDA des astrocytes corticaux aient peu ou pas de sensibilité au Mg²⁺ (Schipke et al., 2001). En absence de blocage Mg²⁺, les astrocytes corticaux peuvent être activés par le glutamate indépendamment du voltage membranaire. Dans les astrocytes de l'hippocampe, la présence de récepteurs au glutamate de type NMDA fonctionnels n'est pas aussi claire que dans le cortex. Dans une tranche d'hippocampe l'activation des récepteurs NMDA induit des courants membranaires (Steinhauser et al., 1994) et des réponses calciques dans les astrocytes (Porter et McCarthy, 1995b; Latour et al., 2001). Cependant, l'application de NMDA sur des astrocytes fraîchement isolés ne produit aucun courant dans ces cellules (Seifert et Steinhauser, 1995).

2.5.2.8.3.4 Récepteurs à l'adénosine A₁, et A₂

L'adénosine peut induire des réponses calciques dans les astrocytes (Peakman et Hill, 1995; Porter et McCarthy, 1995a). Les élévations calciques induites par l'adénosine sont produites par les réserves internes et sont insensibles aux

antagonistes des récepteurs A_1 et A_2 (Porter et McCarthy, 1995a). Le mécanisme précis par lequel l'adénosine induit ces réponses calciques est mal connu.

2.5.2.8.3.5 Récepteurs $GABA_A$

Les récepteurs $GABA_A$ sont des récepteurs canaux perméables au Cl^- . Alors que dans les neurones l'activation des récepteurs $GABA_A$ produit une hyperpolarisation, dans les astrocytes de la tranche d'hippocampe, ces récepteurs dépolarisent généralement la membrane (Steinhauser et al., 1994; Fraser et al., 1995). La différence n'est pas dans le récepteur mais bien dans la différente concentration de Cl^- intracellulaire. Les astrocytes possèdent une concentration de Cl^- intracellulaire supérieure et donc un potentiel d'inversion de cet ion plus positif que dans les neurones. De plus, les astrocytes possèdent, en général, un potentiel membranaire plus hyperpolarisé que les neurones. Toutes ces conditions font donc que dans les astrocytes, l'ouverture du canal Cl^- produit un efflux ionique dépolarisant (Steinhauser et al., 1994).

Dans des conditions particulières qui peuvent s'apparenter à un état pathologique, la dépolarisation causée par les récepteurs GABA est capable d'activer des canaux calciques dépendant du voltage et donc, indirectement, d'induire une élévation calcique (Nilsson et al., 1993; Fraser et al., 1995). En absence de calcium extracellulaire ou en présence de bloqueurs des canaux calciques, les réponses $GABA_A$ sont bloquées ce qui confirme qu'elles sont produites par une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire (Kirchhoff et Kettenmann, 1992; Fraser et al., 1995).

2.5.2.8.3.6 Récepteurs $GABA_B$

Les astrocytes de l'hippocampe possèdent des récepteurs métabotropes sensibles au GABA. Dans les astrocytes de l'hippocampe, l'activation des récepteurs $GABA_B$ par des agonistes spécifiques produit une réponse calcique (Nilsson et al., 1993; Kang et al., 1998). Il est particulier que les récepteurs $GABA_B$ astrocytaires soient reliés à une augmentation calcique puisque, dans les neurones, ces

récepteurs inhibent les canaux calciques. L'élévation calcique produite par ces récepteurs métabotropes au GABA provient du milieu extracellulaire (Kang et al., 1998).

2.5.2.8.3.7 Récepteurs à l'ATP

Les astrocytes possèdent aussi des récepteurs à l'ATP (Porter et McCarthy, 1995a). Les astrocytes expriment les récepteurs ionotropes P2X₁-P2X₄, P2X₆ et P2X₇ mais pas P2X₅ (Kukley et al., 2001). Les astrocytes expriment au moins deux types de récepteurs métabotropes à l'ATP : les récepteurs P2Y₁ et P2Y₂ (Gallagher et Salter, 2003).

2.5.2.8.4 Les astrocytes modulent l'activité de la synapse : le concept de synapse tripartite

Cette section présente les données récentes suggérant que la libération de gliotransmetteurs par les astrocytes module l'activité synaptique. L'ensemble de ces études montre la capacité des astrocytes à jouer un rôle actif, nécessaire et parfois crucial dans la transmission et la plasticité synaptique de l'hippocampe. De plus, l'investigation de la fonction des astrocytes a fait émerger le concept de la synapse tripartite, une organisation où l'astrocyte est présent au niveau de la synapse non seulement du point de vue structurel mais aussi fonctionnel.

Les travaux initiaux furent réalisés sur des co-cultures d'astrocytes et de neurones où la stimulation mécanique, électrique, par photolyse de calcium, par changements d'osmolarité extracellulaire et par l'application de prostaglandine E2 active spécifiquement les astrocytes avec des réponses calciques (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998b; Bezzi et al., 1998; Sanzgiri et al., 1999). Dans ces conditions, il était observé que la stimulation des astrocytes génère aussi des réponses retardées dans les neurones (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998b; Bezzi et al., 1998; Sanzgiri et al., 1999). Les travaux princeps de Alfonso Araque dans l'équipe de Philip Haydon (reproduit depuis par plusieurs laboratoires) ont

montré que l'activation des astrocytes dans la tranche d'hippocampe produit trois types d'effets sur les neurones :

Premièrement, la réponse calcique astrocytaire augmente la fréquence des courants miniatures postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs. Il semble que ce phénomène soit produit par des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Araque et al., 1998a).

Deuxièmement, l'activation des astrocytes produit des courants excitateurs lents (ou *slow inward currents* SIC) et des élévations calciques dans les neurones. Ces courants sont produits suite à l'activation de récepteurs NMDA neuronaux par du glutamate astrocytaire (Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1998b; Sanzgiri et al., 1999).

Troisièmement, l'activation astrocytaire déprime les courants postsynaptiques évoqués excitateurs et inhibiteurs. Cet effet est dû à l'activation de récepteurs mGluR présynaptiques par le glutamate astrocytaire (Araque et al., 1998b).

Ces travaux suggèrent donc que les réponses neuronales observées sont la conséquence directe de la libération de glutamate par les astrocytes. De plus, il semble que la libération de glutamate par les astrocytes utilise une machinerie vésiculaire qui nécessite une élévation calcique (Araque et al., 1998b; Araque et al., 1998a; Bezzi et al., 1998; Kang et al., 1998; Sanzgiri et al., 1999; Innocenti et al., 2000; Parpura et Haydon, 2000) et des protéines SNARE sensibles aux toxines tétaniques et botuliques (Parpura et al., 1995; Bezzi et al., 1998; Hepp et al., 1999; Maienschein et al., 1999; Araque et al., 2000; Pasti et al., 2001).

Plusieurs études ont par la suite confirmé la présence de cette communication bidirectionnelle entre neurones et astrocytes dans des tranches d'hippocampe. Dans ces études, l'activation calcique des astrocytes produit une activation glutamatergique retardée dans les neurones (Pasti et al., 1997). Alors que les études initiales utilisaient la stimulation directe des astrocytes pour moduler l'activité synaptique, une percée remarquable des études subséquentes fut de montrer que cette communication entre l'astrocyte et la synapse pouvait être initiée

par une activité neuronale particulière. Les travaux de Richard Robitaille (Robitaille, 1998) sur les cellules de Schwann, les cellules gliales à la jonction neuromusculaire, sont un des premiers exemples que la modulation de la synapse par la glie peut être initiée par l'activité synaptique. Dans cette étude l'auteur a démontré qu'interférer avec la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G dans la glie empêche à la fois l'activation des cellules de Schwann et la dépression synaptique induite par l'activité neuronale à haute fréquence (Robitaille, 1998). Ces travaux suggèrent donc que l'activation de la cellule gliale par l'activité synaptique à haute fréquence initie une réponse gliale qui cause la dépression synaptique (Robitaille, 1998). La modulation synaptique par la glie est donc une boucle rétroactive (de la synapse à la glie et de retour à la synapse) qui a lieu dans la fonction synaptique.

L'équipe de Ken McCarthy a ensuite fait la démonstration que dans le système nerveux central les astrocytes aussi modulent la transmission excitatrice par une boucle rétroactive (Fiacco et McCarthy, 2004). En libérant du glutamate sur les neurones, les astrocytes peuvent aussi faciliter la transmission synaptique excitatrice dans la région CA1 de l'hippocampe (Fiacco et McCarthy, 2004). Cette modulation serait due à un effet excitateur des récepteurs mGluR du groupe 1 présynaptiques (Fiacco et McCarthy, 2004).

Les astrocytes contrôlent aussi la transmission inhibitrice dans l'hippocampe (Figure 21 C). La stimulation des astrocytes augmente la fréquence des courants miniatures inhibiteurs et potentialise la transmission inhibitrice vers les cellules pyramidales (Kang et al., 1998). Ce phénomène astrocytaire serait responsable de la PLT de la transmission inhibitrice produite par la stimulation répétée des interneurones (Kang et al., 1998). Cette PLT serait induite lorsque le GABA libéré par les interneurones active les récepteurs GABA_B des astrocytes, élève le calcium cytosolique et cause une relâche de glutamate (Kang et al., 1998). En retour, ce

glutamate active les récepteurs AMPA et NMDA des interneurons et potentialise la libération de GABA (Kang et al., 1998).

Il est intrigant de remarquer la relation particulière entre la fonction des astrocytes et les récepteurs NMDA. Premièrement, les astrocytes contrôlent la présence des deux co-agonistes des récepteurs NMDA. D'un côté, les astrocytes libèrent la D-sérine, co-agoniste nécessaire à l'activation des récepteurs NMDA (Schell et al., 1995; Panatier et al., 2006). De l'autre, avec leurs transporteurs spécifiques, les astrocytes régulent la concentration de glutamate disponible à la synapse pour activer les récepteurs NMDA (Tong et Jahr, 1994; Bergles et Jahr, 1997, 1998; Turecek et Trussell, 2000; Oliet et al., 2001; Huang et Bergles, 2004). De plus, les astrocytes peuvent libérer du glutamate et activer directement les récepteurs NMDA sur les neurones (Pasti et al., 1997; Araque et al., 1998a; Bezzi et al., 1998; Parri et al., 2001). Finalement, le glutamate libéré par les astrocytes permet la synchronisation du réseau neuronal par les récepteurs (Fellin et al., 2004). Les astrocytes contrôlent donc de façon spécifique l'activation des récepteurs NMDA.

La modulation synaptique par les astrocytes n'engage pas toujours le glutamate. Les astrocytes peuvent libérer d'autres molécules actives ou gliotransmetteurs comme l'ATP (Zhang et al., 2003). Ces résultats montrent que le glutamate libéré par l'activité synaptique à haute fréquence active les astrocytes qui, en retour, libèrent de l'ATP (Zhang et al., 2003). Cet ATP, une fois dégradé en adénosine, cause une suppression synaptique de très courte durée (moins de 1 sec) aux synapses stimulées (phénomène homosynaptique) et aux synapses adjacentes (phénomène hétérosynaptique) (Zhang et al., 2003). Cette étude de Zhang est la première évidence que le recrutement des astrocytes par l'activité synaptique à haute fréquence des collatérales de Schaffer est impliqué dans une boucle de rétroaction négative homo et hétérosynaptique (Figure 21 B). Ces mécanismes de

rétroaction en boucle suggèrent donc que l'astrocyte peut moduler l'activité synaptique de façon homosynaptique et hétérosynaptique (Figure 21).

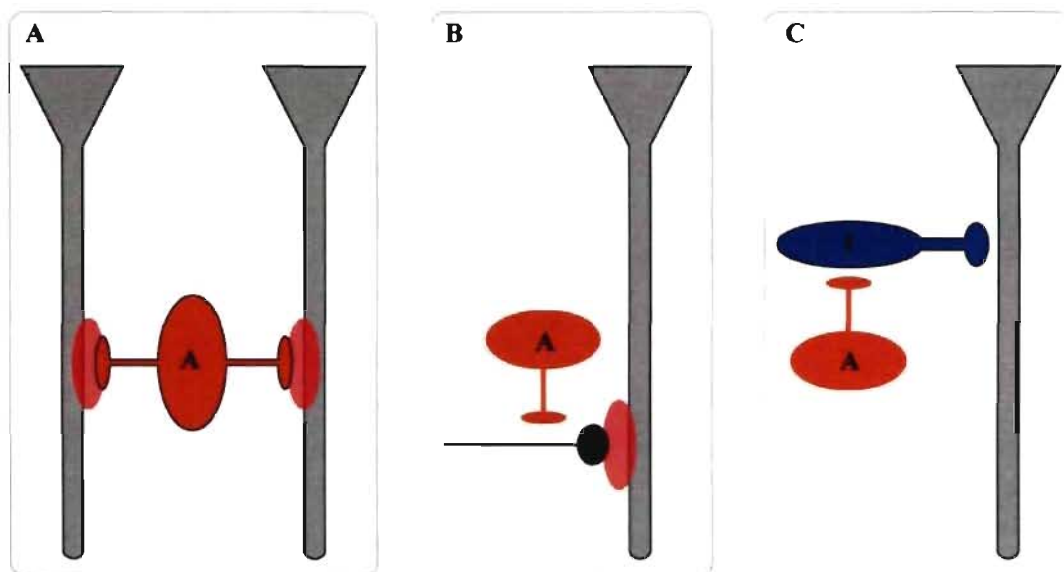


Figure 21. Quatre différents types de modulations que les astrocytes exercent sur l'excitabilité neuronale dans la région CA1 de l'hippocampe.

A) En excitant deux cellules pyramidales adjacentes les astrocytes peuvent contribuer à synchroniser des circuits de l'hippocampe. Dans ce cas, l'élévation calcique dans l'astrocyte induit la libération de glutamate qui active plusieurs cellules pyramidales simultanément. Adapté de Fellin et al. (2004). **B)** En supprimant la relâche de glutamate par les collatérales de Schaffer suite à une forte stimulation, les astrocytes causent la suppression homosynaptique de la transmission synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe. Dans cette boucle rétroactive de contrôle synaptique, les astrocytes excitées par l'activité synaptique intense, libèrent de l'ATP qui dégradé en adénosine supprime présynaptiquement la transmission synaptique. Adapté de Zhang et al. (2003). **C)** Dans un autre type de boucle rétroactive de contrôle synaptique, les astrocytes peuvent potentialiser la transmission synaptique inhibitrice en agissant sur les interneurons inhibiteurs de l'hippocampe. Les astrocytes activés par le GABA libéré par les interneurons libèrent en retour du glutamate sur les interneurons ce qui potentialise la libération de GABA. Adapté de Kang et al. (1998).

2.5.2.8.4.1 Les astrocytes contrôlent le glutamate libre à la synapse

En contrôlant la concentration de glutamate libre à la synapse, les astrocytes possèdent un mécanisme supplémentaire de modulation synaptique.

Il existe dans le système nerveux six types différents de transporteurs au glutamate : EAAT1 ou GLAST (EAAT pour *excitatory amino acid transporter* et GLAST pour *glutamate aspartate transporter*), EAAT2 ou GLT-1 (GLT pour *glutamate transporter 1*), EAAT3 (ou EAAC1), EAAT4 et EAAT5 (Huang et Bergles, 2004). Il fut initialement proposé que le glutamate était recapté par la membrane du neurone présynaptique pour y être recyclé et libéré à nouveau (Logan et Snyder, 1971). Des données plus récentes suggèrent qu'EAAT1 et EAAT2, qui sont les transporteurs les plus abondants (Haugeto et al., 1996; Rothstein et al., 1996), sont uniquement présents sur la membrane des astrocytes apposée à la synapse (Rothstein et al., 1994; Lehre et al., 1995; Lehre et Danbolt, 1998). L'isolement de la synapse par les prolongements astrocytaires devient ici un concept critique puisqu'il assure la fonction double d'isoler physiquement la synapse pour réduire la diffusion de glutamate (Ventura et Harris, 1999) et de recapter le glutamate de la fente synaptique (Huang et Bergles, 2004). Une fois transporté dans les astrocytes, le glutamate est transformé en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine est ensuite transférée vers le neurone où elle est recyclée en glutamate.

Contrairement aux neurones, les propriétés astrocytaires favorisent la recapture de glutamate. Leur potentiel membranaire hyperpolarisé favorise le transport de glutamate qui utilise, entre autres, le gradient de Na^+ et K^+ pour effectuer le transport. En fait, 1 proton H^+ et 3 ions Na^+ sont co-transportés avec le glutamate vers l'intérieur de la cellule tandis qu'un ion K^+ est contre-transporté vers l'extérieur (Zerangue et Kavanaugh, 1996; Danbolt, 2001). Au contraire, les transporteurs de glutamate présents sur les membranes neuronales doivent composer avec des potentiels membranaires plus dépolarisés et qui fluctuent constamment (Huang et Bergles, 2004). La contribution relative de chaque transporteur astrocytaire ou neuronal est difficilement évaluable du à l'absence d'antagonistes spécifiques à chaque transporteur (Huang et Bergles, 2004). L'utilisation de souris transgéniques dont le gène d'un transporteur a été supprimé

permet d'évaluer la contribution spécifique de chaque transporteur (Tanaka et al., 1997). Les souris dont le transporteur astrocytaire (GLT-1 ou GLAST) est absent montrent d'avantage de signes pathologiques comme des crises épileptiques, des concentrations élevée de glutamate extracellulaire et de l'excitotoxicité (Peghini et al., 1997; Huang et Bergles, 2004). Cependant, lorsque les transporteurs neuronaux (EAAC1 ou EAAT4) sont supprimés, les souris ne montrent pas de phénotype évident (Tanaka et al., 1997; Watase et al., 1998). Le rôle crucial des astrocytes dans le transport de glutamate est particulièrement évident dans l'hypothalamus lorsque les prolongements astrocytaires se retirent des synapses pendant la lactation (Theodosis et Poulain, 1993). Dans ces conditions, le recouvrement astrocytaire des synapses et le transport de glutamate est réduit ce qui cause une augmentation de la diffusion de neurotransmetteurs et de l'activation de récepteurs extra et hétérosynaptiques (Oliet et al., 2001). Ceci montre donc l'importance des astrocytes dans le contrôle du glutamate à la synapse.

2.5.2.8.4.2 Relation entre les astrocytes et la concentration d'adénosine extracellulaire

Nous avons vu que les astrocytes, en augmentant le niveau d'adénosine extracellulaire, modulent l'efficacité de la transmission synaptique. Il existe, en fait, trois principaux mécanismes par lesquels la concentration d'adénosine extracellulaire peut être augmentée. Premièrement, la molécule d'adénosine est incluse dans les purines et les nucléotides purinergiques comme l'ATP (Dunwiddie et Masino, 2001). La dégradation de l'ATP par des enzymes extracellulaires, les ectonucléotidases, déphosphorylent l'ATP en ADP, AMP puis en adénosine (Zimmermann et Braun, 1999). Le deuxième mécanisme de relâche d'adénosine est par diffusion facilitée par un transporteur spécifique. Ces transporteurs sont passifs et donc déplacent l'adénosine uniquement en fonction du gradient intracellulaire/extracellulaire d'adénosine (Dunwiddie et Masino, 2001). Il est peu probable qu'un tel mécanisme soit responsable d'une élévation soudaine d'adénosine extracellulaire à moins d'une augmentation d'adénosine dans le cytoplasme cellulaire (Dunwiddie et Masino, 2001). Il existe aussi des

transporteurs d'adénosine qui utilisent le gradient Na^+ pour effectuer un transport actif mais il existe peu d'information sur ce type de transporteurs (Dunwiddie et Masino, 2001). Le troisième mécanisme est la relâche d'adénosine par les astrocytes. Il semblerait que les astrocytes puissent non seulement relâcher de l'ATP qui s'accumule en adénosine (Pascual et al., 2005) mais aussi libérer directement de l'adénosine (Martin et al., 2007). Il n'existe cependant aucune donnée montrant la présence d'un transporteur vésiculaire d'adénosine dans les astrocytes, suggérant que l'adénosine n'est pas libérée par un mécanisme vésiculaire.

2.5.2.8.4.3 Connectivité entre les astrocytes

Une des particularités qui distingue la majorité des astrocytes de l'hippocampe des autres populations cellulaires de cette structure est qu'ils forment un réseau hautement connecté (Giaume et McCarthy, 1996). Cette propriété de couplage des astrocytes est caractéristique d'une sous population d'astrocytes de l'hippocampe (Wallraff et al., 2004). Le couplage entre astrocytes est présent dans la plupart des régions du cerveau et ces connexions sont formées par des jonctions GAP (Binmoller et Muller, 1992) qui établissent des canaux permettant la communication intercellulaire (D'Ambrosio et al., 1998). Il y a plus de jonctions GAP entre les astrocytes qu'entre toute autre population de cellules dans l'hippocampe (Rouach et al., 2002). Chaque jonction gap est composée de deux hémicanaux (un dans chaque cellule interconnectée), c'est-à-dire un connexon (Dermietzel et Spray, 1998). Chaque hémicanal est un hexamère composé par l'assemblage de 6 sous-unités protéiniques, que l'on nomme connexines (Cx) (Bruzzone et al., 1996; Sosinsky et Nicholson, 2005). Les différentes connexines sont classées selon leur poids moléculaire (Cx43, Cx26, etc.), caractéristique qui est encodée par des gènes différents appartenant à une même famille (Bruzzone et al., 1996; Kumar et Gilula, 1996). Les jonctions GAP entre astrocytes sont préférentiellement formées par des connexines Cx43 (Yamamoto et al., 1990; Dermietzel et al., 1991; Giaume et al., 1991; Nadarajah et al., 1996; Rash et al.,

2001). Toutefois, les jonctions GAP astrocytaires contiennent aussi des connexines Cx26 (Alvarez-Maubecin et al., 2000; Nagy et al., 2001), Cx30 (Nagy et al., 1999; Dermietzel et al., 2000; Nagy et al., 2001; Rash et al., 2001), Cx40 (Dermietzel et al., 2000) et Cx45 (Dermietzel et al., 2000).

L'activation ou l'activité des astrocytes a traditionnellement été rapportée sous la forme d'élévations calciques intracellulaires (Verkhratsky et al., 1998). Dans des conditions très particulières de stimulation et de milieu extracellulaire, la propagation synchronisée de cette signalisation calcique entre astrocytes peut générer une vague calcique dans le réseau astrocytaire (Cornell-Bell et Finkbeiner, 1991).

Curieusement, la communication inter-astrocytaire ne serait pas uniquement médiée par les jonctions GAP (Rouach et al., 2002). En fait, deux mécanismes principaux de communication calcique inter-astrocytaire semblent être présents. D'un côté, plusieurs observations appuient le rôle des jonctions GAP dans la propagation des vagues calciques entre astrocytes. Premièrement, les canaux formés par les jonctions GAP sont perméables au Ca^{2+} et à l' IP_3 (Boitano et al., 1992; Charles et al., 1993; Sanderson et al., 1994; Sneyd et al., 1994; Sneyd et al., 1995; Wang et al., 1997). Deuxièmement, les drogues qui bloquent les jonctions GAP réduisent aussi la propagation des vagues calciques (Finkbeiner, 1992; Venance et al., 1995; Venance et al., 1997; Scemes et al., 1998; Blomstrand et al., 1999). Troisièmement, certaines études ont rapporté que la propagation des vagues calciques est indépendante de la vitesse et la direction de la perfusion (Fatatis et Russell, 1992; Finkbeiner, 1992) et de la dégradation de l'ATP (Fatatis et Russell, 1992; Venance et al., 1997; Giaume et Venance, 1998; Charles et Giaume, 2002). Finalement, l'injection intracellulaire de molécules qui lient le Ca^{2+} (comme le BAPTA) abolissent les vagues calciques (Wang et al., 1997).

D'autres études démontrent plutôt l'importance d'un messager extracellulaire et minimisent le rôle des jonctions GAP. Premièrement, les vagues calciques peuvent être transmises à travers des espaces exempts de cellules (Hassingier et al., 1996; Charles, 1998; Wang et al., 2000) selon la vitesse et la direction de la perfusion. Deuxièmement, certaines drogues qui bloquent les jonctions GAP n'affectent pas la propagation des vagues calciques (Guan et al., 1997). Troisièmement, dans les souris knock-out pour la connexine Cx43, la propagation des vagues calciques est peu affectée (Naus et al., 1997; Scemes et al., 1998) ce qui suggère la présence d'un messager extracellulaire. Plusieurs études ont démontré l'importance de l'ATP pour la communication inter-astrocytaire et la propagation des vagues calciques entre astrocytes. Premièrement, les antagonistes des récepteurs purinergiques et les enzymes qui dégradent l'ATP bloquent les vagues calciques (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Fam et al., 2000; Scemes et al., 2000; Wang et al., 2000; Newman, 2001). Deuxièmement, pendant la vague calcique il y a une augmentation de la concentration en ATP dans le milieu extracellulaire (Cotrina et al., 1998). Troisièmement, l'application de milieu prélevé pendant la propagation d'une première vague calcique peut induire une deuxième vague calcique (Guthrie et al., 1999). Quatrièmement, la propagation de la vague d'ATP entre les cellules peut être visualisée avec la technique de la fluorescence de la luciférine/luciférase, une enzyme autofluorescente spécifique à l'ATP (Wang et al., 2000; Newman, 2001). Cinquièmement, la diffusion d'ATP est même observée lorsque la vague calcique est empêchée (Wang et al., 2000).

Ces deux séries d'études sur les mécanismes de propagation des vagues calciques ont donné lieu à deux théories sur la communication interastrocytaire :

La première théorie (Figure 22 en haut) suggère qu'une vague intracellulaire régénérée d'IP₃ diffuse par les jonctions GAP (Rooney et Thomas, 1993; Sanderson et al., 1994; Wang et al., 1997) et induit une relâche de Ca²⁺ qui provient des stores internes (Enkvist et McCarthy, 1992; Finkbeiner, 1992;

Berridge, 1993; Charles et al., 1993; Nedergaard, 1994; Venance et al., 1995). La vague initiale d'IP₃ (Sneyd et al., 1995) est régénérée par la réponse calcique dans chaque cellule (Parker et Yao, 1991; Jaffe, 1993; Yao et al., 1995).

La deuxième théorie (Figure 22 en bas) suggère qu'un messager extracellulaire, l'ATP, diffuse entre les astrocytes environnants sans impliquer les jonctions GAP et active chaque astrocyte de façon indépendante (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Wang et al., 2000). Les élévations calciques dans chacun des astrocytes seraient donc des conséquences de l'activation des astrocytes par l'ATP. Wang (Wang et al., 2000) propose que l'ATP active la PLC dans les astrocytes. L'accumulation de DAG et d'IP₃ produit ensuite deux phénomènes : la réponse calcique et la libération d'ATP (Wang et al., 2000).

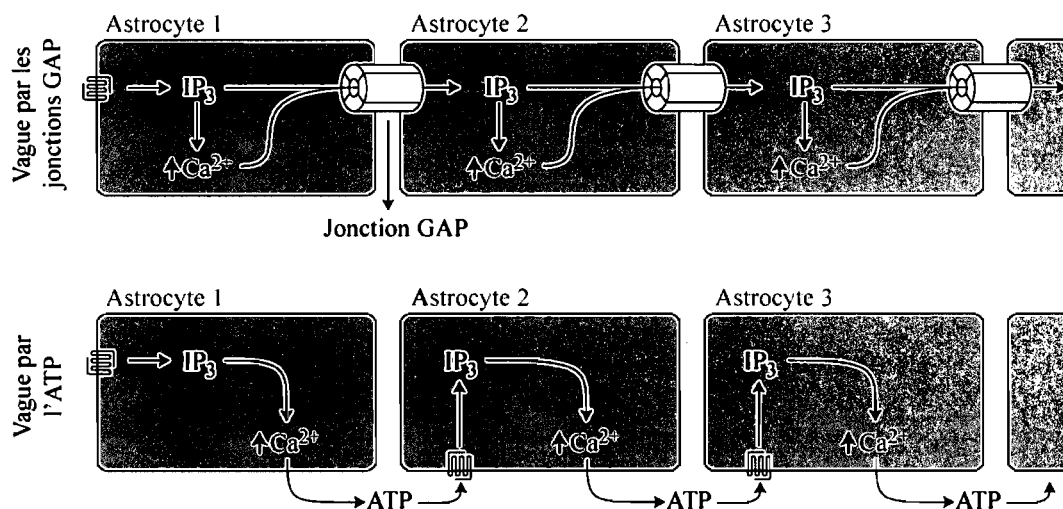


Figure 22. Mécanismes de vagues calciques.

Diagramme illustrant les deux principaux mécanismes contribuant à la production de vagues calciques : diffusion d'IP₃ et de Ca²⁺ à travers les jonctions GAP (en haut) et libération d'ATP extracellulaire (en bas). Adapté de Kettenmann et Ransom (2005).

Des études récentes ont démontré l'implication des deux mécanismes (jonctions GAP et ATP extracellulaire) et suggèrent une théorie unifiée de la communication inter-astrocytaire (Iacobas et al., 2006). Dans ce contexte, certains ont même

suggéré que l'ATP pourrait être directement libéré par des hémicanaux de jonctions GAP (Stout et al., 2002; Gomes et al., 2005).

En conclusion, il existe différentes populations d'astrocytes dont les rôles particuliers dans les synapses de l'hippocampe restent à déterminer en termes d'excitabilité, de sensibilité à l'activité synaptique et de contribution relative à la plasticité synaptique. Il est maintenant évident que les courants membranaires et la réponse calcique astrocytaire sont une forme d'excitabilité et de communication cellulaire. Il semble cependant intrigant que l'activation de tous ces récepteurs ait la même conséquence physiologique : l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique. Des données récentes suggèrent que la différence dans la signalisation réside dans les différents récepteurs et voies activés, la cinétique et l'amplitude des réponses, l'activation de différentes protéines sensibles au calcium, la présence de microdomaines et la propagation locale ou globale du signal calcique (Perea et Araque, 2005a, b, c). Ce sont ces différences dans l'excitabilité astrocytaire qui permettent à ces cellules d'intégrer l'activité neuronale et de contribuer à la modulation fine de la transmission synaptique comme un élément fonctionnel de la synapse tripartite.

3 BUT DE LA THÈSE

La transmission synaptique est un mécanisme fondamental au transfert d'information dans le cerveau. Dans la conception classique de l'organisation synaptique, la transmission nécessite l'interaction de deux éléments : le neurone présynaptique et le neurone postsynaptique. Aujourd'hui, une vision plus inclusive de la transmission synaptique met en valeur le rôle d'un troisième élément : les astrocytes, essentiels au fonctionnement de la synapse. Cette vision est à l'origine du concept de la *synapse tripartite* (Araque et al., 1999).

Les mécanismes de l'apprentissage et de la mémoire sont basés, au niveau cellulaire, sur des modifications à long terme de la transmission synaptique (Lynch, 2004). La potentialisation à long-terme, une forme de plasticité synaptique soutenue, a été identifiée dans l'hippocampe (Lynch, 2004). De récentes découvertes suggèrent une contribution importante des astrocytes dans la potentialisation à long-terme (Nishiyama et al., 2002; Yang et al., 2003). De plus, l'induction de la potentialisation à long-terme est aussi associée avec une dépression hétérosynaptique (Lynch et al., 1977; Dunwiddie et Lynch, 1978). L'induction de cette dépression hétérosynaptique dépend de l'activation des récepteurs NMDA et de la libération d'adénosine (Manzoni et al., 1994).

Les mécanismes qui sous-tendent la dépression hétérosynaptique sont peu connus et plusieurs indices pointent vers un rôle des astrocytes. Premièrement, l'activation des astrocytes est sensible à la transmission synaptique dépendant des récepteurs NMDA (Porter et McCarthy, 1995b; Latour et al., 2001). Deuxièmement, les astrocytes sont particulièrement activés par la fréquence de l'activité synaptique induisant la dépression hétérosynaptique (Latour et al., 2001). Troisièmement, les astrocytes peuvent libérer l'adénosine ou un précurseur (ATP) (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Zhang et al., 2003).

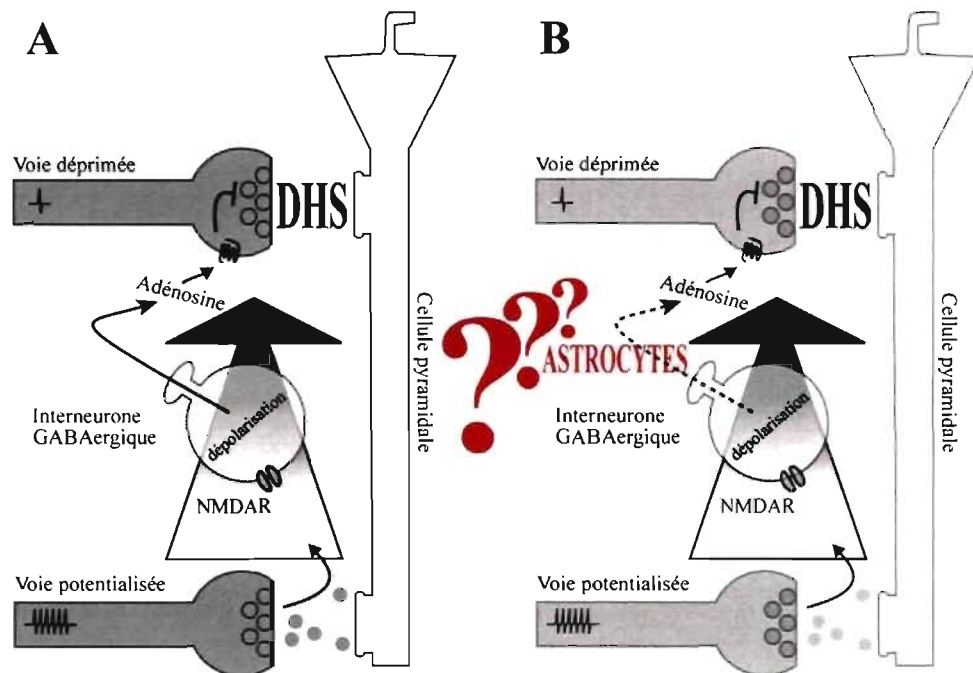


Figure 23. Les astrocytes jouent-ils un rôle clé dans la dépression hétérosynaptique?

A) Schéma illustrant le mécanisme proposé pour la dépression hétérosynaptique (DHS) (Manzoni et al., 1994). B) Schéma suggérant un rôle des astrocytes comme intermédiaires dans le mécanisme de la dépression hétérosynaptique.

Dans ce contexte, le but général de cette thèse est donc d'identifier le rôle des astrocytes dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe et plus particulièrement dans la dépression hétérosynaptique.

Les objectifs particuliers de cette thèse sont de répondre aux questions suivantes :

- 1) Quel est le rôle des astrocytes dans la dépression hétérosynaptique dépendante des récepteurs NMDA dans l'hippocampe ?
- 2) Quels sont les mécanismes d'activation des astrocytes par les récepteurs NMDA ?

Pour répondre aux objectifs fixés, j'ai effectué des expériences d'électrophysiologie et d'imagerie calcique par fluorescence. Les travaux de la

thèse se distinguent particulièrement par l'utilisation en parallèle de plusieurs méthodes expérimentales.

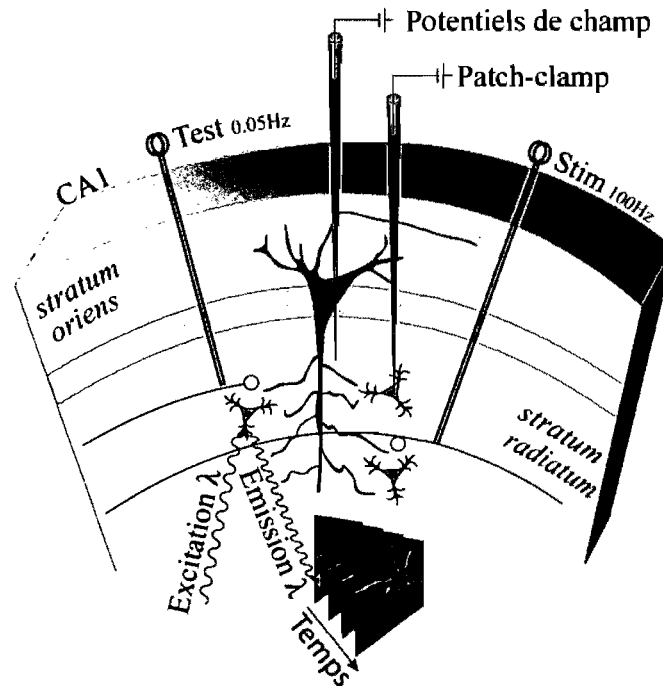


Figure 24. Enregistrement simultané de l'activation astrocytaire et des propriétés électrophysiologiques du réseau.

Le schéma montre l'utilisation en parallèle de l'imagerie calcique, du patch-clamp et de l'enregistrement des potentiels de champ.

Cette thèse comprend deux sections :

La première section examine la relation entre l'activation des astrocytes par l'activité synaptique à haute fréquence et l'induction de la dépression hétérosynaptique. Cette section comprend l'article intitulé *GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression* publié dans *The Journal of Neuroscience* Mai 2006; 26(20), p.5370-5382.

Dans la deuxième section, les différents mécanismes d'activation des astrocytes par le NMDA (réponse calcique, dépolarisation du potentiel membranaire, diminution de la résistance membranaire et modulation du couplage inter-astrocytaire) sont analysés. Cette section comporte l'article intitulé *Astrocyte*

subtype-specific modulation by NMDA in mouse hippocampus en révision dans le journal GLIA.

4 PREMIER CHAPITRE DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Ce chapitre comporte la publication suivante :

Alexandre Serrano, Nasser Haddjeri, Jean-Claude Lacaille, Richard Robitaille. *GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression*. Journal of Neuroscience. Mai 2006; 26(20), p.5370-5382.

Le co-auteur Nasser Haddjeri a réalisé les expériences préliminaires avec l'application de NMDA et il a observé l'activation gliale pendant la dépression induite par le NMDA. Toutes les expériences incluses dans l'article et la caractérisation du phénomène ont été réalisées par l'auteur de cette thèse et premier auteur de l'article: Alexandre Serrano.

La dépression hétérosynaptique est induite par la stimulation à haute fréquence des collatérales de Schaffer dans l'hippocampe. Cette forme de plasticité synaptique est un mécanisme clé dans l'apprentissage et la mémoire. Sachant que les astrocytes sont importants dans la fonction synaptique, nous avons investigué le rôle de ces cellules dans la dépression hétérosynaptique. Nous avons observé que des élévations de Ca^{2+} cytosolique sont induites par la même stimulation qui induit la dépression hétérosynaptique et la dépression induite par le NMDA. Nous avons démontré qu'empêcher cette élévation calcique prévient l'induction de la dépression hétérosynaptique et la dépression induite par le NMDA. Ceci suggère donc que l'activation calcique des astrocytes est nécessaire à l'induction de la dépression hétérosynaptique. L'élévation calcique et la dépression hétérosynaptique sont tout les deux bloqués par l'antagoniste des récepteurs GABAB, le CGP55845. Cette observation suggère que les deux phénomènes, l'activation du réseau astrocytaire et la dépression hétérosynaptique sont

indirectement médiés par les interneurons GABAergiques. Inversement, l'agoniste des récepteurs GABA_B, le baclofen, induit une élévation calcique dans les astrocytes et cause la dépression de la transmission synaptique. L'antagoniste de récepteurs A₁ à l'adénosine, le CPT, empêche l'induction de la dépression hétérosynaptique ou la dépression induite par le NMDA mais n'affecte pas l'élévation calcique dans les astrocytes. Ceci suggère que l'adénosine est engagée dans l'induction de la dépression hétérosynaptique mais qu'elle joue un rôle en aval des astrocytes. Finalement, nos résultats suggèrent que l'adénosine provient de la dégradation de l'ATP par des enzymes extracellulaires. Cette étude suggère que la dépression hétérosynaptique est le résultat d'une interaction entre les collatérales de Schaffer stimulées, les interneurons GABAergiques, le réseau astrocytaire et les terminaisons des collatérales non-stimulées. Nous en concluons que le réseau astrocytaire est fonctionnellement couplé au réseau neuronal pour produire des formes de plasticité hétérosynaptique dans l'hippocampe.

4.1 GABAERGIC NETWORK ACTIVATION OF GLIAL CELLS UNDERLIES HIPPOCAMPAL HETEROSYNAPTIC DEPRESSION

Alexandre Serrano, Nasser Haddjeri, Jean-Claude Lacaille, and Richard Robitaille

Centre de Recherche en Sciences Neurologiques et Département de physiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec
CANADA H3C 3J7.

Acknowledgments :

We thank Carola Schipke for stimulating discussions and for reading the manuscript. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to RR and JCL. A.S. was supported by a fellowship from the Groupe de Recherche sur le système nerveux central (GRSNC) of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). N.H. was supported by a postdoctoral fellowship of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). J.-C.L. is the recipient of a Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology. R.R. is the recipient of a CIHR investigator award. N.H. current address: Laboratory of neuropharmacology and Neurochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Claude Bernard Lyon I, EA-512, 8 Avenue Rockefeller 69373 LYON Cedex 08, France.

4.1.1 ABSTRACT

Tetanus-induced heterosynaptic depression in the hippocampus is a key cellular mechanism in neural networks implicated in learning and memory. A growing body of evidence indicates that glial cells are important modulators of synaptic

functions, but very little is known about their role in heterosynaptic plasticity. We examined the role of glial cells in heterosynaptic depression knowing that tetanization and NMDA application caused depression of synaptic field responses (fEPSP) and induced Ca^{2+} rise in glial cells. Here we report that chelating Ca^{2+} in a glial syncytium interfered with heterosynaptic depression and NMDA-induced fEPSP depression suggesting that Ca^{2+} activation of glial cells is necessary for heterosynaptic depression. NMDA-induced Ca^{2+} rise in glial cells was tetrodotoxin-sensitive and reduced by the GABAB antagonist CGP55845. Both heterosynaptic depression and simultaneous Ca^{2+} activation of glial cells were prevented by CGP55845 suggesting an involvement of GABAergic network in glial activation and heterosynaptic depression. Also, the GABAB agonist baclofen caused both a Ca^{2+} rise in glial cells and fEPSP depression. Heterosynaptic depression, as well as NMDA- and baclofen-induced depression, were attenuated by an A1 antagonist (CPT), whereas glial cell activation was not, indicating a role of adenosine downstream of glial activation. Finally, heterosynaptic depression requires ATP degradation since ectonucleotidase inhibitors reduced this plasticity. Our work indicates that Ca^{2+} activation of glial cells is necessary for heterosynaptic depression, which involves sequentially Schaffer collaterals, GABAergic network and glia interactions. Thus, glial and neuronal networks are functionally associated during the genesis of heterosynaptic plasticity at mammalian central excitatory synapses.

4.1.2 INTRODUCTION

Multiple lines of evidence indicate that glial cells are active partners modulating neuronal activity (Auld and Robitaille, 2003a). In hippocampus, glial cells are known to sense synaptic activity at Schaffer collaterals (Dani et al., 1992; Pasti et al., 1997) and respond to such activity with rises in intracellular calcium levels (Porter and McCarthy, 1996; Carmignoto et al., 1998; Latour et al., 2001). Following their Ca^{2+} -mediated activation, hippocampal glial cells communicate with neurons to modulate both excitatory (Araque et al., 1998a; Araque et al.,

1998b; Araque et al., 2001; Pasti et al., 2001; Koizumi et al., 2003) and inhibitory synaptic transmission (Kang et al., 1998). Moreover, at the neuromuscular junction, activation of perisynaptic glial cells by synaptic activity is accompanied by feedback modulation of synaptic efficacy and short-term plasticity (Robitaille, 1998; Auld and Robitaille, 2003a, b). While such synapse-glial-synapse regulatory loop has been identified in the periphery (Auld and Robitaille, 2003a), the involvement of glial cells in such a role at CNS synapses has only recently begun to be explored (Zhang et al., 2003; Pascual et al., 2005).

Interestingly, properties of glial cell activity and modulation are in register with the neuronal properties required to induce heterosynaptic plasticity in the CNS. For instance, frequency-dependent synaptic transmission that activates glial cells is known to induce synaptic plasticity. In addition, the neurotransmitter and receptor systems that mediate synaptic plasticity are also implicated in the activation of glial cells (Haydon, 2001; Auld and Robitaille, 2003a). These characteristics are particularly striking when considering the production of hippocampal heterosynaptic depression. Heterosynaptic depression is a correlate of long-term potentiation (LTP) at Schaffer collateral synapses of the hippocampus (Lynch et al., 1977) and is believed to increase the contrast between potentiated and other non-tetanized inputs on pyramidal neurons. Similar to LTP, heterosynaptic depression is dependent upon N-methyl-D-aspartic (NMDA) receptor activation (Manzoni et al., 1994) in a frequency-dependent manner (Lynch et al., 1977). Additionally, heterosynaptic depression has been proposed to be mediated by local interneuron networks producing presynaptic inhibition of neurotransmitter release by adenosine (Manzoni et al., 1994). Interestingly, Ca²⁺-mediated activation of glial cells by hippocampal synaptic activity has been found to exhibit similar properties to those of heterosynaptic depression, such as dependence on NMDA receptor activation and stimulus frequency, as well as involving adenosine release (Auld and Robitaille, 2003a). Finally, an elegant recent study has shown that

integrity of the glial vesicular release machinery is necessary for complete induction of heterosynaptic depression (Pascual et al., 2005).

Hence, the present study was undertaken to determine the involvement of glial cells in heterosynaptic depression at Schaffer collateral synapses in hippocampal networks in situ. Our data show that glial cells in rat CA1 hippocampal slices are activated by Ca^{2+} -mediated processes during heterosynaptic depression. Moreover, their activation involves local network interactions between afferent fibers, GABAergic system and glial cells, and is necessary for heterosynaptic depression. These findings underscore a novel physiological interactive role for the GABAergic network and glial cells in synaptic plasticity at CNS synapses. Part of this work has been previously presented in abstract form (Serrano et al., 2003).

4.1.3 MATERIALS AND METHODS

4.1.3.1 HIPPOCAMPAL SLICES

Transverse hippocampal slices were obtained from young (14–21 days) male Sprague-Dawley rats (Charles River, Montreal, Canada) as described previously (Latour et al., 2001). Rats were anaesthetized 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 (except for baclofen experiments where 2 mM KCl was used), 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 (Leica Instruments). Slices were transferred to a container filled with oxygenated ACSF at room temperature and allowed to recover for one hour.

4.1.3.2 CONFOCAL MICROSCOPY AND Ca^{2+} IMAGING

Cells were loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo3-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) as described previously (Latour et al., 2001). Slices were incubated for one hour at 37°C in oxygenated ACSF containing 30 μM fluo3-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 one hour. Individual slices were then placed in a chamber mounted on the stage of an upright laser scanning confocal microscope (BioRad MRC-600) installed on an Olympus BH5 microscope equipped with a 40X water-immersion objective (0.75 NA). The slice was submerged and continuously perfused with oxygenated ACSF (2 ml/min). Fluorescent glial cells were visually identified in stratum radiatum of the CA1 region, based on their small soma diameter ($< 10 \mu\text{m}$) and their dispersed distribution (see below electrophysiology and also Latour et al., 2001 for detailed glial cell identification parameters). The 488-nm excitation line of the laser was attenuated to 1% of maximum power, and emission was detected through a barrier filter with cutoff 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 2 sec and recorded using MPL software (BioRad). The images were further analyzed off-line using ImageJ (NIH) and 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 300 control images were taken prior to drug application. Changes in fluorescence (ΔF), 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, the time to peak, the half-maximal recovery and the area under the response, calculated using a trapezoidal rule-based algorithm (SigmaPlot), were determined. Ca^{2+} responses were elicited by bath application (3 min) of drugs or stimulation of the Schaffer collateral pathway (3 trains at 100 Hz for 1 sec at 30 sec intervals). Cells in which the Ca^{2+} response did not recover to baseline were discarded from analysis.

The experimental procedure was as follow: control Ca^{2+} responses and fEPSP depression (see electrophysiology) were simultaneously recorded from a slice and

induced by bath application of drugs (NMDA and baclofen) or Schaffer collateral stimulation. Fifty minutes after the first agonist application or stimulation, Ca²⁺ responses and fEPSP recordings were again measured simultaneously in the same slice in the presence of blockers. Blockers were applied to the whole slice via bath perfusion: D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5, 50 μ M), tetrodotoxin (TTX, 1 μ M), (RS)-alpha-ethyl-4-carboxyphenylglycine (E4CPG, 400 μ M), (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl] (phenylmethyl) phosphinic acid (CGP55845, 2 μ M), 3-Aminopropyl (diethoxymethyl) phosphinic acid (CGP35348, 500 μ M), [S-(R*,R*)]-[3-[[1-(3,4-Dichlorophenyl) ethyl] amino]-2-hydroxypropyl] (cyclohexylmethyl) phosphinic acid (CGP54626, 0.1 μ M), dipyridamole (DPM, 10 μ M), 6-N,N-diethyl- β -dibromomethylene-D-adenosine-5'-triphosphate (ARL67156, 100 μ M) and cyclopentyl-theophylline (CPT, 2 μ M). Ca²⁺ responses were reproducible and responses in control and in the presence of blockers were compared as paired experiments. The Ca²⁺ chelator 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra-acetic acid tetrapotassium salt (BAPTA) was dialyzed specifically in glial cells using whole-cell recordings.

4.1.3.3 ELECTROPHYSIOLOGY

A micropipette filled with ACSF was positioned in stratum radiatum of CA1 area to record fEPSPs, using an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments, Inc.) in bridge mode. For tetanization-induced heterosynaptic depression, two ultra-small concentric bipolar electrodes (Frederick Haer Co., Brunswick, ME) were placed in stratum radiatum for electrical stimulation of two independent Schaffer collateral pathways (test pathway: single pulse at 0.05 Hz, 100-900 μ A, 50-65 μ s duration; tetanized pathway: 3 trains at 100 Hz for 1 sec at 30 sec intervals, same intensity as test pathway). For synaptic depression induced by NMDA(25 μ M) and baclofen(20 μ M), a single test pathway was used and the agonist was bath applied for 3 min. Electrophysiological signals were filtered at 1 KHz, digitized at 2 KHz (TL-1, Axon Instruments), acquired and analyzed on a PC using pClamp software.

For whole cell recordings and BAPTA dialysis, pipettes were pulled from borosilicate glass (1 mm O.D., A-M Systems) and filled with (in mM): 150 K-methylsulfate, 1MgCl₂, 8 NaCl, 2 ATP, 0.4 GTP, 10 HEPES, 0.15% biocytin and 0.1 BAPTA (with 40 mM BAPTA, K-methylsulfate was omitted), titrated with KOH to pH 7.2–7.25 and adjusted to 275–285 mOsm (electrode resistance, 4–8 MΩ). Whole-cell recordings were obtained from glial cells in stratum radiatum under visual guidance where fluorescent glial cells were previously identified using confocal microscopy. Whole cell current-clamp recordings were made using an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments) in bridge mode. The bridge balance was regularly monitored and adjusted using the bridge circuit.

Glial cells were identified based on the size ($< 10 \mu\text{m}$) and shape of the cells as observed under the fluorescent microscope according to the criteria presented in Latour et al. (2001). In addition, recorded cells showed no electrical excitability (no action potential produced), had a low membrane potential ($\sim -80 \text{ mV}$) and a low membrane resistance ($< 15 \text{ M}\Omega$). Most importantly, the recording of one glial cell usually resulted in the staining of a large number of glial cells by the biocytin included in the patch pipette. To our knowledge, only a certain category of astrocytes are electrically coupled to such an extent (Wallraff et al., 2004).

4.1.3.4 HISTOLOGY

After whole-cell recordings, slices containing biocytin-filled cells were transferred to a freshly prepared solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer and fixed for 4–12 h at 4°C. Slices were washed and stored in 0.1 M phosphate buffer and then embedded in agarose and re-sectioned at 50–80 μm thickness with a vibratome. 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 D.P.X. medium (distyrene, plasticizer, and xylene mixture) and examined under a light microscope to count the number of labeled cells.

4.1.3.5 STATISTICAL ANALYSIS

Experiments were performed on the same slices in control and drug conditions. Thus, statistical significance of differences between groups was assessed using Student's paired t-test. The level of significance was set at $p < 0.05$. SigmaStat statistical software (SPSS) was used for statistical analysis. All measures are expressed as mean \pm S.E.M.

4.1.4 RESULTS

4.1.4.1 CA^{2+} -MEDIATED ACTIVATION OF GLIAL CELLS DURING HETEROSYNAPTIC DEPRESSION

We induced heterosynaptic depression in rat hippocampal slices by high frequency stimulation of a subset of Schaffer collaterals (tetanized pathway: 3 trains at 100 Hz for 1 sec at 30 sec intervals, Fig. 1 A). Depression of synaptic transmission was measured in a different and independent set of Schaffer collateral-pyramidal cell synapses using field potential recordings (test pathway: single pulse stimulation at 0.05 Hz, Fig. 1 A). High frequency stimulation of the tetanized pathway induced a transient reduction of field excitatory post-synaptic potentials (fEPSP) in the test pathway (Fig 1B, C, upper panels).

Heterosynaptic depression is known to be NMDA receptor-dependent (Manzoni et al., 1994). In the presence of the NMDA receptor antagonist, D-AP5 (50 μ M), two phases of fEPSP depression could be distinguished. A first short-lasting phase took place only seconds after tetanization and was independent of NMDA receptors (Fig. 1 B and E). A second slower phase lasting more than 5 minutes was significantly reduced by D-AP5 and was considered as heterosynaptic depression (representative experiment in Fig. 1 B, shaded area). For the group of slices tested, maximal heterosynaptic depression occurred at 2.2 ± 0.1 min after onset of high frequency stimulation (Fig. 1 C upper panel, D) and fEPSPs were depressed to 68.2 ± 7.9 % of baseline (n=5 slices). In presence of D-AP5, heterosynaptic depression was significantly reduced and fEPSP amplitude remained at 87.9 ± 8.1

% of baseline (n=5 slices, Student's paired t-test, $p < 0.05$), reaching a peak at 1.6 ± 0.5 min after tetanization.

A prerequisite for the involvement of glial cells in heterosynaptic depression is that they are activated by the stimulation protocol for heterosynaptic depression and that this activation precedes the induction of the depression. We used simultaneous calcium imaging and fEPSP recordings to monitor variations of intracellular calcium levels (Ca^{2+}) in glial cells in close proximity ($\leq 100 \mu\text{m}$) to the fEPSP recording electrode, during heterosynaptic depression. The same stimulation protocol used to induce heterosynaptic depression also caused a Ca^{2+} elevation in glial cells (Fig. 1 B lower panel, mean response from 8 glial cells in the single field recording experiment shown in the upper panel). Stimulation-induced Ca^{2+} elevations in glial cells were also blocked by the NMDA receptor antagonist, D-AP5 (Fig. 1 B, C lower panel). Importantly, in every slice examined in control conditions, Ca^{2+} responses were elicited in glial cells during the three trains of stimuli, as well as after the trains, and these glial Ca^{2+} responses preceded the occurrence of heterosynaptic depression (Fig. 1 C, D). For the 5 slices examined, the mean time to peak of Ca^{2+} responses of all glial cells in a given slice (1.34 ± 0.12 min) was significantly less than the mean time to peak of fEPSP heterosynaptic depression (2.14 ± 0.13 min; Student's paired t-test, $p < 0.01$, Fig. 1 C, D). These results indicate that the peak latency of Ca^{2+} rises in glial cells evoked by Schaffer collateral stimulation preceded that of heterosynaptic depression. Hence, the requirement that activation of glial cells takes place prior to the occurrence of the synaptic depression is fulfilled.

We recorded fEPSPs in the test pathway between tetani to test whether the EPSP amplitude was depressed during the stimulation period. In these slices, fEPSP amplitude between trains of stimulation was not significantly different from baseline amplitude (n=5 slices; Student's paired t-test, $p > 0.7$, Fig. 1 E). These observations suggest that heterosynaptic depression develops after the third train

of stimulation and hence, that glial cells are activated prior to the development of tetanus-induced heterosynaptic depression. Since others, in contrast, have reported heterosynaptic depression following single train of stimulation (Pascual et al., 2005, Manzoni et al., 1994), the variability in the induction of heterosynaptic depression indicates that it is important to examine the temporal relationship between glial Ca²⁺ responses and depression of synaptic responses in the same experiments, as was done in the present study.

4.1.4.2 CAN HETEROSYNAPTIC DEPRESSION BE MIMICKED PHARMACOLOGICALLY ?

Given the role of NMDA receptors in tetanus-induced heterosynaptic depression and Ca²⁺ activation of glial cells, we examined the effects of NMDA on fEPSPs and glial cell Ca²⁺ levels. Bath application of NMDA (25 μM) depressed fEPSPs to 4.2 ± 5.1 % of baseline with a maximal reduction occurring at 16.8 ± 1.4 min after the onset of drug application (Fig. 2 A). NMDA-induced depression was prevented by the NMDA receptor antagonist D-AP5 (50 μM, Student's paired t-test, $p < 0.001$, Fig. 2 A). Interestingly, the same NMDA application also caused a transient elevation of Ca²⁺ in glial cells (Fig. 2 B). The relative increase of Ca²⁺ in glial cells reached a peak of 64.4 ± 4.3 % $\Delta F/F$, with a latency of 11.5 ± 0.5 min after the onset of NMDA application and recovered to half-maximal effect at 14.4 ± 0.8 min after onset of drug application. The slow kinetics of the Ca²⁺ responses may be the result of the bath application of the agonist (see also Porter and McCarthy, 1995 and Kang et al., 1998). The NMDA-induced rise of Ca²⁺ in glial cells was blocked by the NMDA receptor antagonist D-AP5 (50 μM; $n=54$ cells from 7 slices, Student's paired t-test, $p < 0.001$, Fig. 2 B). Hence, the depression induced by NMDA application and tetanus stimulation are NMDA-dependent suggesting that NMDA application can be used as a pharmacological tool to study the mechanisms of heterosynaptic depression.

4.1.4.3 IS Ca^{2+} -MEDIATED ACTIVATION OF GLIAL CELLS NECESSARY FOR HETEROSYNAPTIC DEPRESSION ?

To test if Ca^{2+} -mediated glial cell activation was necessary for the induction of heterosynaptic depression, we blocked glial Ca^{2+} responses by intracellular dialysis of the Ca^{2+} chelator BAPTA in glial cells using whole cell recordings. BAPTA was dialyzed during recordings from a single glial cell via a patch pipette that also contained biocytin to visualize a syncytium of glial cells that was labeled following NMDA application (biocytin-labeled glial cells \approx 20-200 and covering an area of \sim 300 μm in diameter, example in Fig. 3 A; see also Latour et al, 2001). Using intracellular labeling with Oregon-green BAPTA, a Ca^{2+} indicator of the BAPTA family (with a higher molecular weight than BAPTA alone), a similar spread into the glial syncytium was observed after NMDA application, thus indicating that dialyzed BAPTA spreaded into the syncytium (Fig. 3 B, green cells). Identification of glial cells was confirmed by electrophysiological criteria (low resting membrane potential, absence of action potential), which were clearly different from interneurons in the same layer (Fig. 3B, in red).

We next tested the effect of dialyzed BAPTA on NMDA-induced Ca^{2+} responses. In control conditions, with a low concentration of BAPTA (0.1 mM) dialyzed into glial cells, the NMDA-induced Ca^{2+} rise was reduced to 60.7 ± 4.6 % of control (Student's paired t-test, $p < 0.02$; Figure 3D) owing to normal rundown of fluorescence (see also Latour et al., 2001, and Figure 5A). However, after a high concentration of BAPTA (40 mM) was dialyzed in glial cells, the NMDA-induced rise of Ca^{2+} post-BAPTA was significantly reduced to 6.3 ± 5.1 % of control ($n=43$ cells in 5 slices, Student's paired t-test, $p < 0.01$, Fig. 3 C-D). Hence, dialysis of a high concentration of BAPTA caused a 93.7% reduction of NMDA-induced rise of Ca^{2+} in glial cells that was significantly larger than the 39.3% reduction caused in control with low concentration of BAPTA (Student's t-test, $p=0.01$). Additionally, in control conditions, dialysis of a low concentration of BAPTA (0.1 mM) did not reduce significantly the number of responsive glial cells (74.8 ± 23.3

% of control, Student's paired t-test, $p > 0.2$, Fig. 3 E). Conversely, the number of responsive glial cells after the dialysis of a high concentration of BAPTA (40 mM) was significantly reduced to 45.7 ± 18.6 % of control (Student's paired t-test, $p = 0.01$, Fig. 3 E). Importantly, basic properties of glial cells were not affected during these experiments. Indeed, in 40 mM BAPTA, membrane potential ($E_m = \sim -80$ mV) and membrane resistance ($R_m = \sim 15$ M Ω) were similar to control values. Moreover, in another series of experiments, the depolarization of glial cells induced by NMDA was unaffected by 40 mM BAPTA (Serrano, Robitaille and Lacaille, unpublished observations). Hence, glial cells appeared intact and functional. As a whole, these results indicate that the dialysis of 40 mM BAPTA via whole cell recordings impaired Ca^{2+} activation induced by NMDA in a significant number of glial cells.

We next evaluated the effect of preventing Ca^{2+} -mediated activation of glial cells on heterosynaptic depression (Fig. 4 A). In control conditions, with a low concentration of BAPTA (0.1 mM), there was no significant change in heterosynaptic depression in the same slices before and after BAPTA dialysis in glial cells ($n = 7$ slices, Fig. 4 B). The peak of the initial phase, time to peak and the amplitude of the sustained phase measured 5 minutes after induction of heterosynaptic depression were unchanged (Student's paired t-test, $p > 0.3$). In contrast, in separate experiments with 40 mM BAPTA dialyzed in glial cells, heterosynaptic depression was significantly reduced and recovered faster (Fig. 4 C-D). In these experiments, before BAPTA dialysis, tetanization depressed fEPSP amplitude to 13.2 ± 4.6 % of baseline at the peak of the initial phase and to 53.3 ± 5.2 % of baseline during the sustained phase (5 min after tetanization), with half-maximal recovery occurring at 3.5 ± 1.2 min after tetanization. After 40 mM BAPTA dialysis in glial cells, the NMDA-independent initial phase of depression of fEPSPs induced by tetanization (see Fig. 1 B), was unchanged (to 11.1 ± 3.9 % of baseline; Student's paired t-test, $p > 0.4$). However, half-maximal recovery from depression occurred significantly faster (1.0 ± 6.8 min, Student's paired t-test,

$p < 0.03$) and the depression of fEPSPs during the sustained phase was prevented. In this phase, the fEPSP amplitude was reduced only to 82.5 ± 2.8 % of baseline ($n=7$ slices, Student's paired t-test, $p < 0.01$, Fig. 4 C-D). These results indicate that preventing Ca^{2+} -mediated activation of glial cells did not affect the initial NMDA-independent phase of depression induced by tetanization, but inhibited the sustained NMDA-dependent phase of heterosynaptic depression. Hence, Ca^{2+} -mediated activation of glial cells seems necessary for the complete expression of tetanization-induced heterosynaptic depression. This effect was not due to the leakage of BAPTA in extracellular space and buffering Ca^{2+} , thus reducing transmitter release, since the presence of the BAPTA-containing patch-pipette for 30 minutes in slices did not affect fEPSP amplitude (data not shown).

4.1.4.4 INDIRECT MECHANISM OF GLIAL CELL ACTIVATION DURING NMDA-INDUCED SYNAPTIC DEPRESSION

We next investigated whether glial cells could be activated directly by NMDA (Schipke et al., 2001) during NMDA-induced synaptic depression. To test this possibility, we applied NMDA in the presence of TTX ($1 \mu\text{M}$) to block action potential propagation and synaptic transmission. NMDA-induced rise of Ca^{2+} in glial cells showed significant rundown with repeated application of NMDA (57.9 ± 12.3 % of control, Student's t-test, $p < 0.01$; Fig. 5 A; see also Fig. 3D). In TTX, NMDA-induced rise of Ca^{2+} in glial cells was significantly reduced to 30.6 ± 13.0 % of control ($n=56$ cells in 9 slices, Student's paired t-test, $p < 0.001$, Fig. 5 B-C). Moreover, the time to peak of the Ca^{2+} rise was 12.4 ± 0.6 min in TTX, which was significantly delayed relative to control conditions (9.1 ± 0.5 min in control). Also, in the presence of TTX, the number of responsive glial cells per field of view in a slice was significantly reduced by 69.2 ± 5.4 % (Student's paired t-test, $p < 0.001$, Fig. 5 C). Our results suggest that Ca^{2+} -mediated glial activation during NMDA-induced depression was indirect and involved neuronal elements.

Additionally, we tested if coupling of glial cells following NMDA application was also affected by TTX. Dialysis of biocytin in a single glial cell resulted in labeling

of a reduced number of cells (2.7 ± 1.2 cells; $n=3$ slices). After application of NMDA, the number of biocytin-labeled glial cells was 123.3 ± 53.6 cells ($n=10$ slices; example in Fig. 3 A). However, after application of NMDA in the presence of TTX, only 4.3 ± 1.8 glial cells ($n=3$ slices) were labeled with biocytin (Student's paired t-test, $p<0.05$). These results suggest that NMDA-induced coupling of glial cells is also indirect and involves activation of the neuronal network.

We next wondered if indirect glial activation involved glutamate release from Schaffer collaterals and activation of metabotropic glutamate receptors (mGluR) (Porter and McCarthy, 1996; Latour et al., 2001). In the presence of E4CPG (400 μ M), a group I/II mGluR antagonist, neither the NMDA-induced synaptic depression nor the Ca^{2+} rise in glial cells were affected. NMDA depressed fEPSPs to 11.7 ± 3.8 % of baseline in control and to 15.4 ± 3.2 % of baseline in the presence of E4CPG ($n=4$ slices, Student's paired t-test, $p>0.4$, data not shown). Also, when glial Ca^{2+} responses were monitored with fEPSP recordings, NMDA-induced a Ca^{2+} rise of 51.7 ± 6.1 % $\Delta F/F$ in glial cells in control conditions and of 51.6 ± 5.7 % $\Delta F/F$ in the presence of E4CPG ($n=8$ cells in 2 slices, Student's paired t-test, $p>0.6$, data not shown). Our results indicate that, group I/II mGluR activation is not involved in either NMDA-induced depression of fEPSP and Ca^{2+} responses in glial cells.

4.1.4.5 ROLE OF GABA IN HETEROSYNAPTIC DEPRESSION AND ACTIVATION OF GLIAL CELLS

Since hippocampal γ -aminobutyric acid (GABA) interneurons express NMDA receptors (Freund and Buzsaki, 1996) and their activation elicits GABAB-mediated Ca^{2+} rises in glial cells (Kang et al., 1998), we next tested if the GABAergic system contributes to heterosynaptic depression. Heterosynaptic depression was measured simultaneously with Ca^{2+} levels in glial cells in control conditions and in the presence of the GABAB antagonist CGP55845. In the presence of CGP55845 (2 μ M), both the tetanus-induced rise of Ca^{2+} in glial cells

and heterosynaptic depression of fEPSPs were significantly reduced (Fig. 6 A-B). As shown in Fig. 6A, in CGP55845 (2 μ M) fEPSPs were only depressed to 81.3 ± 4.6 % of baseline, compared to 31.2 ± 5.7 % of baseline in control (n=3 slices, Student's paired t-test, $p < 0.001$), while the glial Ca^{2+} response induced by the stimulation was blocked (n=15 cells in 3 slices, Student's paired t-test, $p < 0.01$, Fig. 6 B). These findings appear inconsistent with those of Manzoni et al. (1994) who found that the less potent GABAB antagonist CGP35348 did not prevent NMDA- and tetanus-induced heterosynaptic depression. This discrepancy may be due to the different efficacy of the GABAB receptor antagonists used (Davies et al., 1993). To examine this possibility, we tested the effect on heterosynaptic depression of CGP35348 and another new generation GABAB antagonist CGP54626. When tested in the same slices, depression of fEPSPs was not significantly different in control (to 74.2 ± 0.8 % of baseline) and in the presence of CGP35348 (to 75.5 ± 2.2 % of baseline; n=3 slices, $p > 0.05$ ANOVA, Tukey's test) but was significantly reduced in the presence of CGP54626 (to 91.4 ± 0.7 % of baseline; $p < 0.001$ ANOVA, Tukey's test). These data suggest that neuronal and glial GABAB receptors may differ in terms of pharmacological profile, but, moreover, clearly indicate that Ca^{2+} -mediated glial activation during heterosynaptic depression requires GABAB receptors. Hence, these data suggest that the inhibition of NMDA-induced glial activation by TTX (Fig. 5 B) is due to the block of action potential propagation in GABAergic cells and reduction of GABA release. These results further suggest that the indirect Ca^{2+} -mediated activation of glial cells during the NMDA-induced depression involves the GABAergic system.

We next asked whether GABAB receptors were involved in NMDA-induced heterosynaptic depression. In control, NMDA depressed fEPSP amplitude to 1.6 ± 4.2 % of baseline with a peak at 12.9 ± 2.3 min after drug onset, whereas fEPSPs were only reduced to 41.1 ± 9.3 % of baseline at 11.5 ± 0.8 min after drug onset in the presence of CGP55845 (2 μ M; n=6 slices, Student's paired t-test, $p < 0.01$; Fig.

7 A). In CGP55845, the glial Ca^{2+} response induced by NMDA was completely abolished ($n=47$ cells in 6 slices, Student's paired t-test, $p<0.001$, Fig. 7 B). Thus, NMDA-induced depression and heterosynaptic depression share as another common step, the activation of GABAB receptors.

We next tested whether bypassing local GABA release and directly activating GABAB receptors with an agonist would induce fEPSP depression and Ca^{2+} responses in glial cells. As shown in Figure 7C, bath application of the GABAB agonist baclofen ($20 \mu\text{M}$) depressed fEPSPs to 5.6 ± 5.0 % of baseline with maximal effect at 10.7 ± 2.3 min after onset of drug application ($n=6$ slices), which was blocked by CGP55845 ($2 \mu\text{M}$). Moreover, the same bath application of baclofen induced a glial Ca^{2+} response of 57.0 ± 19.5 % $\Delta\text{F}/\text{F}$ that peaked at 8.3 ± 3.6 min after the onset of drug application ($n=33$ cells, 6 slices, Fig. 7 D). The baclofen-induced rise of Ca^{2+} in glial cells was blocked also by CGP55845 (Student's paired t-test, $p<0.01$). The glial Ca^{2+} responses induced by baclofen are unlikely to be indirect since they were unaffected by TTX ($1 \mu\text{M}$) ($n=12$ cells, Student's paired t-test, $p>0.5$). Thus, the results of these series of experiments indicate that GABAB receptor activation is necessary and sufficient for Ca^{2+} -mediated glial activation and fEPSP depression, suggesting a critical interaction between the GABAergic network and glial cells in heterosynaptic depression. Moreover, these data suggest that activation of glial GABAB receptors occurs downstream from GABA release in the induction cascade of heterosynaptic depression since the GABAB agonist directly activated glial cells.

4.1.4.6 IS Ca^{2+} -MEDIATED ACTIVATION OF GLIAL CELLS NECESSARY FOR NMDA OR BACLOFEN-INDUCED DEPRESSION ?

Given the role of Ca^{2+} activation of glial cells in heterosynaptic depression, we next examined if glial Ca^{2+} activation is also necessary for NMDA-induced synaptic depression. Since bath application of NMDA will activate a number of cellular elements, such as inhibitory interneurons, and consequently affect a larger number of glial cells than those dialyzed with BAPTA, one would predict that

BAPTA dialysis in glial cells would reduce, but not completely block the NMDA-induced depression. In control experiments (i.e., 0.1 mM BAPTA in patch electrode), 25 μ M NMDA similarly depressed fEPSP amplitude before (to 5.4 ± 2.7 % of baseline) and after (to 8.7 ± 4.5 % of baseline) BAPTA dialysis in glial cells ($n=7$ slices; Student's paired t-test, $p>0.3$, Fig. 8 A). However, after dialysis of 40 mM of BAPTA, NMDA depressed fEPSPs only to 30.8 ± 7.6 % of baseline in comparison to 0.1 ± 8.4 % of baseline in control ($n=9$ slices, Student's paired t-test, $p<0.02$; Fig. 8 B-C). Recovery from depression was also significantly faster (half-maximal recovery 10.5 ± 0.8 min before and 8.0 ± 1.2 min after BAPTA dialysis; Student's paired t-test, $p<0.03$). Additionally, none of these changes could be explained by baseline variations in fEPSP since control experiments with vehicle (ACSF) application and whole cell recording with BAPTA-free patch solution remained stable throughout the entire test period (Fig. 8 B). These results indicate that preventing Ca^{2+} activation in glial cells significantly reduced NMDA-induced synaptic depression.

We tested next if baclofen-induced depression was reduced by chelating Ca^{2+} in glial cells. Given the importance of presynaptic GABAB inhibition of glutamatergic synapses (Isaacson et al., 1993), one can predict that only a fraction of the baclofen-induced depression should be blocked by BAPTA dialysis in glial cells. Indeed, after BAPTA (40 mM) was dialyzed into glial cells, baclofen depressed fEPSPs only to 30.7 ± 2.0 % of baseline in comparison to 18.2 ± 1.5 % of baseline in control ($n=5$ slices, Student's paired t-test, $p<0.001$; Fig. 8 D-E). Note that in these experiments, NMDA application was needed between the pre- and post- BAPTA baclofen applications to allow BAPTA/biocytin to spread into the syncytium. In control experiments, without BAPTA dialysis in glial cells, repeated applications of baclofen produced similar fEPSP depression (Fig 8 F). These results indicate that inhibition of Ca^{2+} activation in glial cells reduced a small but significant portion of baclofen-induced depression.

4.1.4.7 ADENOSINE A1 RECEPTOR INVOLVEMENT IN HETEROSYNAPTIC DEPRESSION BUT NOT IN GLIAL CELL ACTIVATION

To confirm that heterosynaptic depression is caused by adenosine activating A1 receptors at Schaffer collateral synapses (Manzoni et al., 1994), we induced heterosynaptic depression in the presence of CPT, an antagonist of A1 adenosine receptors. Bath perfusion of CPT (2 μ M) significantly reduced heterosynaptic depression of fEPSP amplitude to 46.1 ± 3.2 % of baseline in control and only to 76.4 ± 6.3 % of baseline in the presence of CPT (n=5 slices, Student's paired t-test, $p < 0.05$, Fig. 9 A). Thus, consistent with previous reports (Manzoni et al., 1994), heterosynaptic depression depends upon adenosine release and activation of A1 receptors. Since adenosine elicits Ca^{2+} elevations in glial cells (Porter and McCarthy, 1995) and glial cells release adenosine and ATP (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Cotrina et al., 2000; Wang et al., 2000; Newman, 2003), we tested the sensitivity of tetanus-induced Ca^{2+} rises in glial cells to CPT (2 μ M). As shown in Figure 9 B, the peak of the tetanus-induced Ca^{2+} rises in glial cells was not affected significantly by CPT (n=16 cells in 3 slices, Student's paired t-test, $p > 0.3$). In control, the peak Ca^{2+} rise was 64.7 ± 39.1 % $\Delta F/F$ whereas, in CPT, the peak Ca^{2+} response was 80.1 ± 53.7 % $\Delta F/F$. These results confirm that tetanus-induced glial cell activation is not mediated via A1 receptors and extracellular release of adenosine. Thus, since adenosine is necessary for the induction of heterosynaptic depression and since glial cell activation is not dependent upon adenosine release, these results suggest that adenosine release occurs downstream from glial cell activation.

We next tested whether NMDA-induced depression also depends on A1 receptor activation (Manzoni et al., 1994). We measured NMDA-induced depression in control conditions and in the presence of bath applied CPT in the same slices. In control, NMDA depressed fEPSPs to 12.8 ± 5.0 % of baseline, but only to 46.1 ± 10.7 % of baseline in CPT (n=5 slices, Student's paired t-test, $p < 0.05$, Fig. 9 C). The remaining depression may be the result of the direct presynaptic GABAB

inhibition caused by the NMDA activation of interneurons and GABA release. Thus, NMDA-induced depression and heterosynaptic depression share a dependence on adenosine release and A1 receptor activation. We also tested whether adenosine activation of A1 receptors occurs downstream of NMDA-induced Ca²⁺ responses in glial cells by examining the sensitivity of NMDA-induced Ca²⁺ rises in glial cells to CPT (2 μM). Neither the peak, nor time to peak of the NMDA-induced Ca²⁺ rises in glial cells were affected significantly by CPT (n=43 cells in 5 slices, Student's paired t-test, p>0.2, Fig. 9 D). In control, the peak Ca²⁺ rise was 128.5 ± 60.2 % ΔF/F and occurred at 5.8 ± 3.0 min after the onset of drug application whereas, in CPT, the peak Ca²⁺ response was 128.9 ± 46.5 % ΔF/F at 5.9 ± 2.7 min after drug application. These results confirm that NMDA-induced glial cell activation is not mediated via A1 receptors and extracellular release of adenosine.

If GABA release is involved in glial cell activation and heterosynaptic depression, then the fEPSP depression induced by the GABAB agonist baclofen (Fig. 7 C-D) should be in part indirectly mediated by adenosine. To test this requirement, we measured baclofen-induced depression in control conditions and in the presence of bath applied CPT (2 μM). In control, baclofen depressed fEPSP amplitude to 32.6 ± 5.9 % of baseline but only to 57.0 ± 11.4 % of baseline in CPT (n=5 slices, Student's paired t-test, p<0.05, Fig. 9 E). These values concord with the proportion of the baclofen-induced depression blocked by BAPTA (see Fig. 8 E) and with the strong inhibition of glutamate release by presynaptic GABAB receptors at Schaffer collaterals. Hence, as for heterosynaptic depression and NMDA-induced depression, baclofen-induced depression also depends on A1 receptor activation for its complete induction. These results indicate that heterosynaptic depression, NMDA and baclofen-induced depression share pathways that similarly converge towards the release of adenosine.

We next examined whether adenosine or its metabolic precursor ATP (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Cotrina et al., 2000; Wang et al., 2000; Newman, 2003) was released from glial cells in heterosynaptic depression using ARL67156 (Gallagher and Salter, 2003) a specific ectonucleotidase inhibitor known to block ATP degradation. If adenosine is produced from ATP degradation, one would expect that heterosynaptic depression should be reduced in the presence of the ectonucleotidase inhibitor. Indeed, bath application of ARL67156 (100 μ M) significantly reduced heterosynaptic depression. In control, fEPSPs were depressed to 66.7 ± 10.9 % of baseline but only to 96.3 ± 1.4 % of baseline in ARL67156 (n=3 slices, Student's paired t-test, $p < 0.05$, Fig. 9 F). Furthermore, similar results were obtained when using another ectonucleotidase inhibitor DPM (Zhang et al., 2003; Connolly and Duley, 2000). Heterosynaptic depression of fEPSP was to 46.1 ± 3.2 % of baseline in control and only to 76.4 ± 6.3 % of baseline in DPM (10 μ M; n=5 slices, Student's paired t-test, $p < 0.05$). Thus, these results suggest that adenosine mediating heterosynaptic depression is a product of ATP degradation.

4.1.5 DISCUSSION

We established that heterosynaptic depression at hippocampal Schaffer collateral synapses depends on interactions between both neuronal and glial elements. These results indicate that tetanized Schaffer collaterals release glutamate, stimulating the GABAergic network, that in turn activates glial cells, that will feedback onto non-tetanized Schaffer collateral synapses to induce heterosynaptic depression (Suppl. Fig. 1). These findings reveal a novel interactive role between neuronal networks and glial cells in modulating efficacy at central excitatory synapses.

4.1.5.1 GLIAL CELL ACTIVATION IS NECESSARY FOR HETEROSYNAPTIC DEPRESSION

Heterosynaptic depression was proposed to arise from release of adenosine by interneurons causing depression of transmitter release (Manzoni et al., 1994). Our

data confirms an involvement of these cellular elements, but further demonstrate the requirement for glial cell activation in heterosynaptic depression.

We found that Ca^{2+} activation of glial cells precedes heterosynaptic depression, and that glial activation appears indirectly mediated by GABA. Indeed, not only was glial activation significantly reduced in TTX, but both heterosynaptic depression and glial cell Ca^{2+} responses were significantly reduced by GABAB receptor antagonists. Heterosynaptic depression was previously reported as GABAB-independent (Manzoni et al., 1994). However, this discrepancy appears due to the different antagonists used: the newer generation and more potent GABAB antagonists (CGP55845 and CGP54626) prevent heterosynaptic depression whereas the less potent antagonist CGP35348 does not.

Furthermore, the GABAB agonist baclofen directly activated glial cells and induced depression, in part independent of presynaptic GABAB inhibition. Hence, our data suggest that activation of glial cells during heterosynaptic depression, NMDA- and baclofen-induced depression, is indirect via local release of GABA. Interestingly, GABAB receptors are expressed in glia (Fraser et al., 1994) and interneuron activation produces GABAB-mediated Ca^{2+} activation of glial cells (Kang et al., 1998). This is an intriguing observation, since GABAB receptors were not known to be positively linked to Ca^{2+} homeostasis. Finally, we observed that activation of the GABAergic system is essential for both heterosynaptic depression and glial cell activation. Therefore, activation of GABAergic network by Schaffer collateral stimulation appears not only necessary but also sufficient for heterosynaptic depression and glial cell activation. Direct recording and selective stimulation of GABA interneurons will be necessary to identify which cells are implicated in heterosynaptic depression. Furthermore, one could have expected that not only NMDA but also AMPA/KA receptors may contribute to GABAergic network activation and induction of heterosynaptic depression. The reasons for such different functional importance of NMDA receptors remain to be elucidated.

Glial activation during heterosynaptic depression does not simply occur in parallel during plasticity since introducing a calcium chelator in glial cells blocked heterosynaptic depression. Thus, Ca²⁺-mediated activation of glial cells is necessary for the induction of heterosynaptic depression. However, whether the glial Ca²⁺ rise is sufficient to induce heterosynaptic depression remains to be established. Our data also confirmed an NMDA-independent plasticity, previously described as heterosynaptic suppression (Zhang et al., 2003), that precedes heterosynaptic depression. This early phase of depression was not blocked by D-AP5, CPT and BAPTA, suggesting that it is distinct from heterosynaptic depression. This early phase may also involve presynaptic GABAB-mediated depression (Isaacson et al., 1993).

Based on our data, a sequence of network interactions underlying heterosynaptic depression can be proposed (Suppl. Fig. 1): 1. glutamate released from tetanized Schaffer collaterals activates GABAergic cells via NMDA receptors; 2. GABA release activates GABAB receptors on glial cells; 3. leading to a Ca²⁺ rise in glial cells; 4. producing ATP release from glial cells, degradation into adenosine and activation of A1 receptors on Schaffer collaterals; and finally, 5. causing presynaptic inhibition of transmitter release. Hence, our main conclusion is that glial cell activation is necessary for heterosynaptic depression.

It is important to place this model in perspective with other known regulatory mechanisms, such as presynaptic GABAB inhibition (Suppl. Fig. 1; Isaacson et al., 1993) to which glial cell mediated heterosynaptic depression will act in complement. Indeed, the lower efficacy of intra-glial dialysis of BAPTA on NMDA- and baclofen-induced depression reflects the co-existence of glial-mediated modulation and other neuronal regulatory mechanisms. However, an important functional difference between these regulatory systems is their temporal feature, with presynaptic GABAB inhibition occurring in seconds (Isaacson et al., 1993) and heterosynaptic depression in minutes (Manzoni et al., 1994).

4.1.5.2 HETEROSYNAPTIC DEPRESSION EMERGES FROM THE COOPERATION BETWEEN NEURONAL AND GLIAL NETWORKS

In addition to glial cell activation being necessary for heterosynaptic depression, our data indicate a glial network involvement. Dialysis of a calcium chelator in a single glial cell reduced the responses of numerous glial cells to NMDA, baclofen or tetanization. Biocytin and Oregon-green BAPTA labeling revealed a network reaching as many as 200 cells over a large area (~300 μm diameter). In contrast, previous studies reported significant dye-coupling in hippocampal astrocytes in "unstimulated" slices (D'Ambrosio et al., 1998; Latour et al., 2001; Wilraff et al., 2004a). The reasons for these differences in level of dye coupling in basal conditions are unclear, but since synaptic activity was found to regulate glial dye-coupling, differences in experimental protocols affecting levels of spontaneous activity may be involved. In any case, reduction of both NMDA- and baclofen-induced depression by calcium buffering in glia suggests a sufficiently extended glial network to modulate synaptic activity over the large area affected by bath applied agonists. Hence, our data imply that a network of glial cells is involved in heterosynaptic depression and provide the first evidence that interacting neuronal and glial networks are essential in hippocampal heterosynaptic depression.

The involvement of a glial network has several important consequences. First, although single glial cell homosynaptic interactions are sufficient for regulatory feedback (Robitaille, 1998; Auld and Robitaille, 2003a; Zhang et al., 2003), a complex glial network seems necessary for heterosynaptic phenomena. Second, ATP released by glial cells appears pluri-potent, mediating A1 receptor presynaptic depression, and propagation of glial activation (Guthrie et al., 1999; Newman, 2003). Third, a glial network involvement implies an extended spatial regulation of synaptic activity in the form of a "center-surround" effect. A center region of tetanized glutamatergic synapses strongly activates pyramidal neurons and GABAergic network. The latter transfer neuronal information to the glial network, extending beyond the area of activated synapses and depressing

surrounding synapses. This center-surround phenomenon increases contrast between tetanized pyramidal cell synapses and surrounding depressed synapses. Thus, a glial network role is important in spreading neuronal information beyond synapses activated directly by pyramidal cell-GABAergic network interactions. Other previously described glutamatergic neuron-glia interactions (Porter and McCarthy, 1996; Carmignoto et al., 1998; Zhang et al., 2003) likely underlie the small residual Ca^{2+} elevations in glial cells in the presence of AP5 and may occur in the center region. Obviously, such center-surround phenomenon is lost during agonist-induced depression.

4.1.5.3 ROLES OF GLIAL CELLS IN PLASTICITY

Bi-directional glia-synapse interactions were described in CNS (Kang et al., 1998, Araque et al., 1998a, Zhang et al., 2003, Fellin et al., 2004, Pascual et al., 2005) and PNS (Robitaille, 1998). Interestingly, glial cell vesicular release machinery appears essential for heterosynaptic depression (Pascual et al., 2005). Using transgenic mice expressing a dominant negative SNARE domain in astrocytes to block exocytosis, hippocampal heterosynaptic depression was found to be impaired, suggesting that ATP may be released from astrocytes via vesicular exocytosis during heterosynaptic depression.

Our data represent the first direct evidence that interference with Ca^{2+} activation of glial cells hampers functional plasticity in neuronal networks. Previous reports of glial cell modulation involved one type of synaptic elements interacting with glial cells (Auld and Robitaille, 2003a), whereas in heterosynaptic depression, three network elements are involved: glutamate synapses activating GABAergic cells; GABA release linking neuronal and glial networks; and glial ATP/adenosine modulating non-tetanized synapses.

4.1.5.4 PERSPECTIVES

Heterosynaptic depression may serve two functions: preventing synaptic saturation by reducing efficacy (Lynch et al., 1977) and increasing contrast between

activated and non-tetanized synapses (Dunwiddie and Lynch, 1978). It may play a role in hippocampal memory functions, owing to its relationship with LTP and effect on synaptic efficacy (Pockett and Lippold, 1986). By showing a glial cell involvement in heterosynaptic depression, we uncover a novel contribution of glial cells in cognitively relevant synaptic plasticity in CNS. At present, this role is most relevant to short-term plasticity and its implication in long-term plasticity remains to be elucidated, although it appears distinct from A1 receptor-independent long-term heterosynaptic depression accompanying LTP (Scanziani et al., 1996).

Our data unveil a novel role of glial cells in a particular form of synaptic plasticity. However, the diversity of glial cell functions, their ability to adapt to synaptic activity (Carmignoto, 2000; Auld and Robitaille, 2003a) and their ubiquitous presence around synaptic elements, are suggestive of glial involvement in other types of plasticity. Thus, we propose that synaptic plasticity is not solely the domain of neurons, but also involves glial cells in a complex, “integrated system”, with cooperative interactions between neuronal and glial networks.

4.1.6 REFERENCES

- 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, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813.
- Auld DS, Robitaille R (2003a) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.

- Auld DS, Robitaille R (2003b) Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist* 9:144-157.
- Carmignoto G (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog Neurobiol* 62:561-581.
- 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.
- Connolly GP, Duley JA (2000) Ecto-nucleotidase of cultured rat superior cervical ganglia: dipyridamole is a novel inhibitor. *Eur J Pharmacol* 397:271-277.
- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15735-15740.
- Cotrina ML, Lin JH, Lopez-Garcia JC, Naus CC, Nedergaard M (2000) ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci* 20:2835-2844.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.
- Davies CH, Pozza MF, Collingridge GL (1993) CGP 55845A: a potent antagonist of GABAB receptors in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 32:1071-1073.
- Dunwiddie T, Lynch G (1978) Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J Physiol* 276:353-367.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11:83-93.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.

- Gallagher CJ, Salter MW (2003) Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J Neurosci* 30:6728-6739.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
- Isaacson JS, Solis JM, Nicoll RA (1993) Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10:165-175.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
- Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11023-11028.
- Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille J-C (2001) Differential mechanisms of Ca²⁺ responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* 11:132-145.
- Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266:737-739.
- Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA (1994) Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265:2098-2101.
- Newman EA (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23:1659-1666.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-116.
- 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.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21:477-484.
- Pockett S, Lippold OCJ (1986) Long-term potentiation and depression in hippocampal slices. *Exp Neurol* 91:481-487.
- 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.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* 15:1270-1272.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R (2003) Involvement of glial cells in heterosynaptic depression at hippocampal Schaffer collateral-pyramidal cell synapses. *Society for Neuroscience* 378.17.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48:36-43.
- Wang Z, Haydon PG, Yeung ES (2000) Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal Chem* 72:2001-2007.
- 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.

Zhang J-M, Wang H-K, Ye C-Q, Ge W, Chen Y, Jiang Z-L, Wu C-P, Poo M-M, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971-982.

4.1.7 FIGURES AND LEGENDS

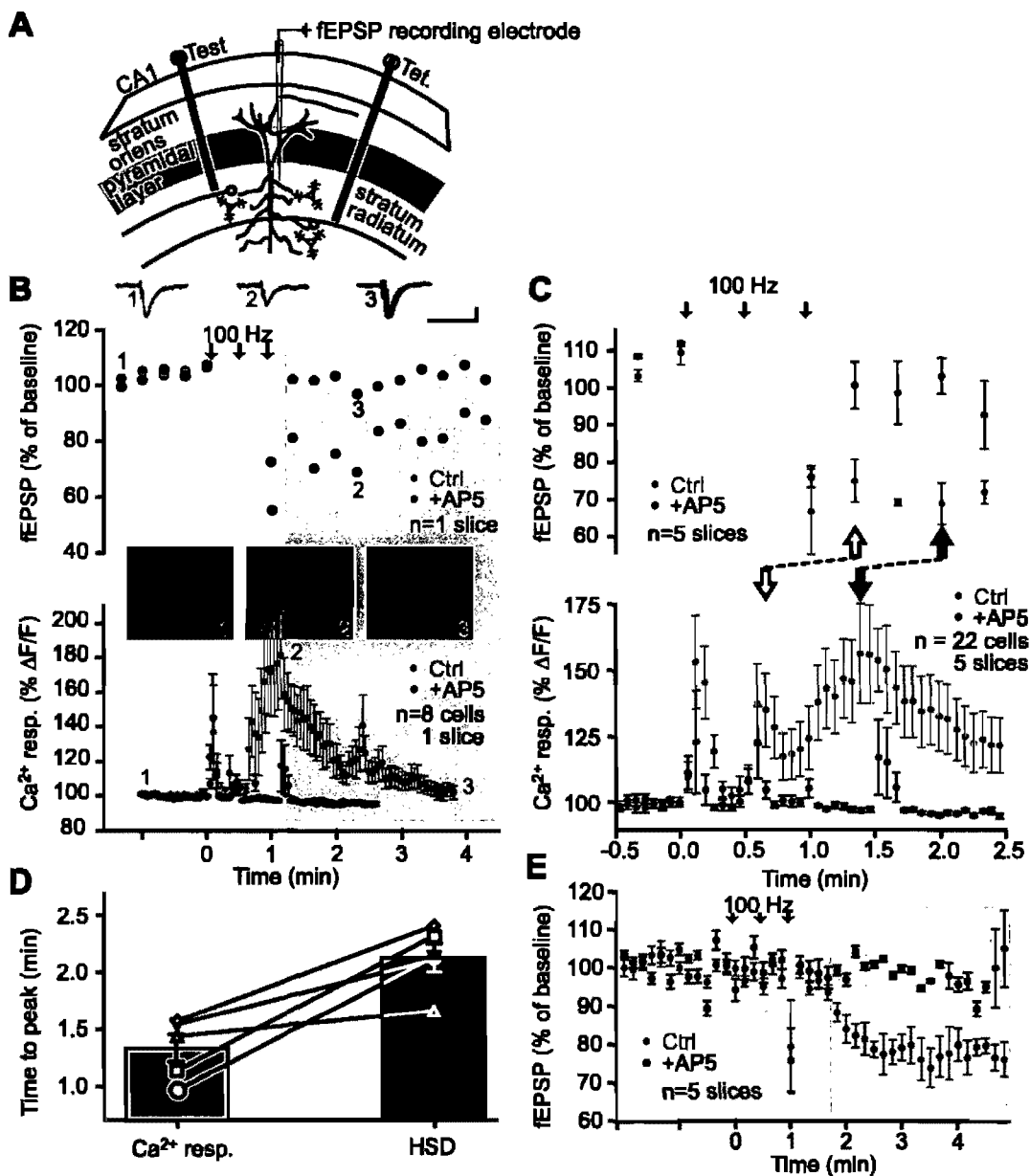


Figure 1. The Ca²⁺ rise in glial cells precedes heterosynaptic depression of fEPSPs. **A**, Schematic representation of area CA1 in a rat hippocampus slice, showing positions of two stimulating electrodes (Test and Tet.) and a single fEPSP recording electrode placed in the stratum radiatum. **B**, Top panel, representative example of changes in fEPSP amplitude in the test pathway of a single slice

experiment, expressed as percentage of baseline, before and after tetanic stimulation of a separate pathway (arrows, trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals), showing heterosynaptic depression in control (gray) and its block by the NMDA receptor antagonist D-AP5 (50 μ M, black). In these and following experiments, control and antagonist applications were paired and effects measured in the same slices. The shaded area represents the period during which NMDA receptor-dependent heterosynaptic depression occurs. Insets show examples of fEPSPs before (1) and during heterosynaptic depression in control (2) and in D-AP5 (3). Lower panel, relative increase in fluorescence for glial cells from the same slice as in the top panel before, during and after tetanic stimulation (as indicated in the top panel) in control (gray) and in the presence of D-AP5 (black). Stimulation elicited glial Ca²⁺ responses that were blocked by 50 μ M D-AP5 (n=8 glial cells). Insets show pseudo-color (blue low level of Ca²⁺, red high level) confocal images of a fluo-3-loaded glial cell before (1), during (2) and after (3) tetanus-induced elevation of Ca²⁺. C, Top panel, changes in average fEPSP amplitude (n = 5 slices) in the test pathway expressed as percentage of baseline, before and after tetanic stimulation of a separate pathway (arrows, trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals), showing heterosynaptic depression in control (gray) and its block by the NMDA receptor antagonist D-AP5 (50 μ M, black). Lower panel, average relative increase in fluorescence (n = 5 slices, 22 glial cells) for glial cells from the same experiments as in the top panel before, during and after tetanic stimulation (as indicated in the top panel) in control (gray) and in the presence of D-AP5 (black). Stimulation elicited glial Ca²⁺ responses that were blocked by 50 μ M D-AP5. Note that only a period of three minutes (30 seconds prior to induction and 2.5 minutes after) is shown to illustrate the timing of the induction of the glial Ca²⁺ response and of NMDA-dependent HSD. The onset (open arrows) of the sustained glial Ca²⁺ response precedes the onset of NMDA-dependent heterosynaptic depression. Likewise, the peak of the Ca²⁺ response (filled arrow) also precedes the peak of the NMDA-dependent heterosynaptic depression. D, Time to peak of the Ca²⁺ rises in glial cells simultaneously

recorded with heterosynaptic depression of fEPSPs for each individual slices (open symbols, full lines). The bar graph represents the mean time to peak of Ca^{2+} responses and depression of fEPSPs for all slices. The mean time to peak of Ca^{2+} rises in glial cells is significantly shorter than the mean time to peak of heterosynaptic depression ($n=5$ slices, Student's paired t-test, $p<0.01$). E, Average changes in fEPSP amplitude expressed as percentage of baseline for five experiments before, during and after tetanic stimulation of Schaffer collaterals (arrows, trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals). Heterosynaptic depression (control, gray) was blocked by the NMDA receptor antagonist D-AP5 (50 μM , black). Note that NMDA-dependent heterosynaptic depression (shaded area) is induced following the third train of stimulation at 100 Hz.

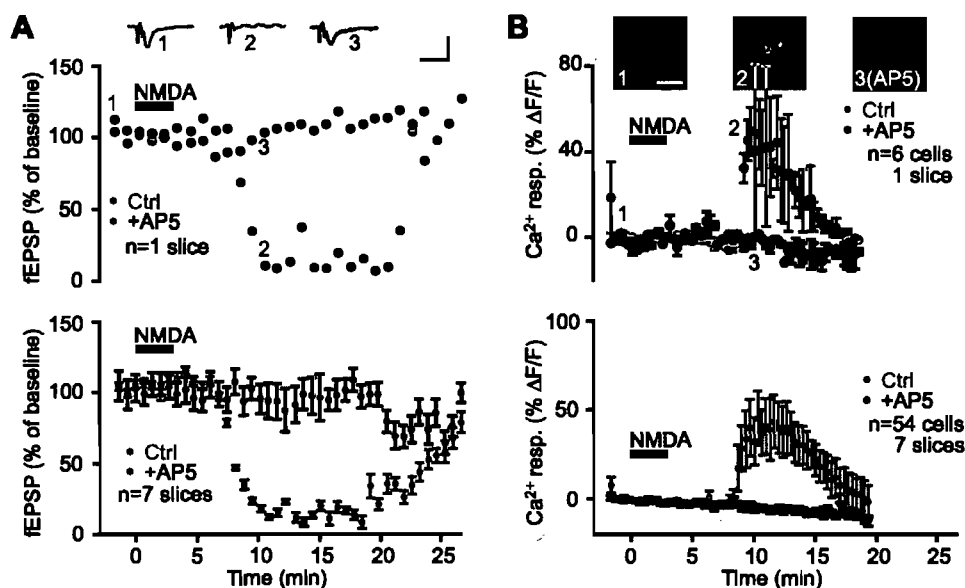


Figure 2. Intracellular Ca^{2+} rise in glial cells and fEPSP depression induced by NMDA application. A, Representative single experiment (top panel, $n=1$ slice) and group data (lower panel, $n=7$ slices) showing changes in fEPSP amplitude expressed as percentage of baseline before, during and after NMDA bath application ($25 \mu\text{M}$; 3 minutes, bar) in paired control experiments and in the presence of D-AP5 ($50 \mu\text{M}$). Bath application of NMDA induced a reduction of fEPSP that was prevented by $50 \mu\text{M}$ D-AP5 ($n=7$ slices, Student's paired t-test, $p<0.001$). Top insets show examples of fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence of D-AP5 (3) (calibration bars 0.5 mV and 40 ms). B, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in the individual slice shown in A (upper panel, $n=6$ cells) and for all slices (lower panel, $n=54$ cells, 7 slices) before, during and after NMDA bath application in control (gray) and in the presence of D-AP5 (black). NMDA elicited glial Ca^{2+} responses that were prevented by $50 \mu\text{M}$ D-AP5 (Student's paired t-test, $p<0.001$). Responses obtained in control and in the presence of D-AP5 were obtained from the same slices as in A. Top insets show pseudo-color (blue-red scale) confocal images of a glial cell loaded with fluo-3AM before (1), during NMDA-induced elevation of Ca^{2+} in control (2) and in the presence of D-AP5 (3) (scale bar $10 \mu\text{m}$).

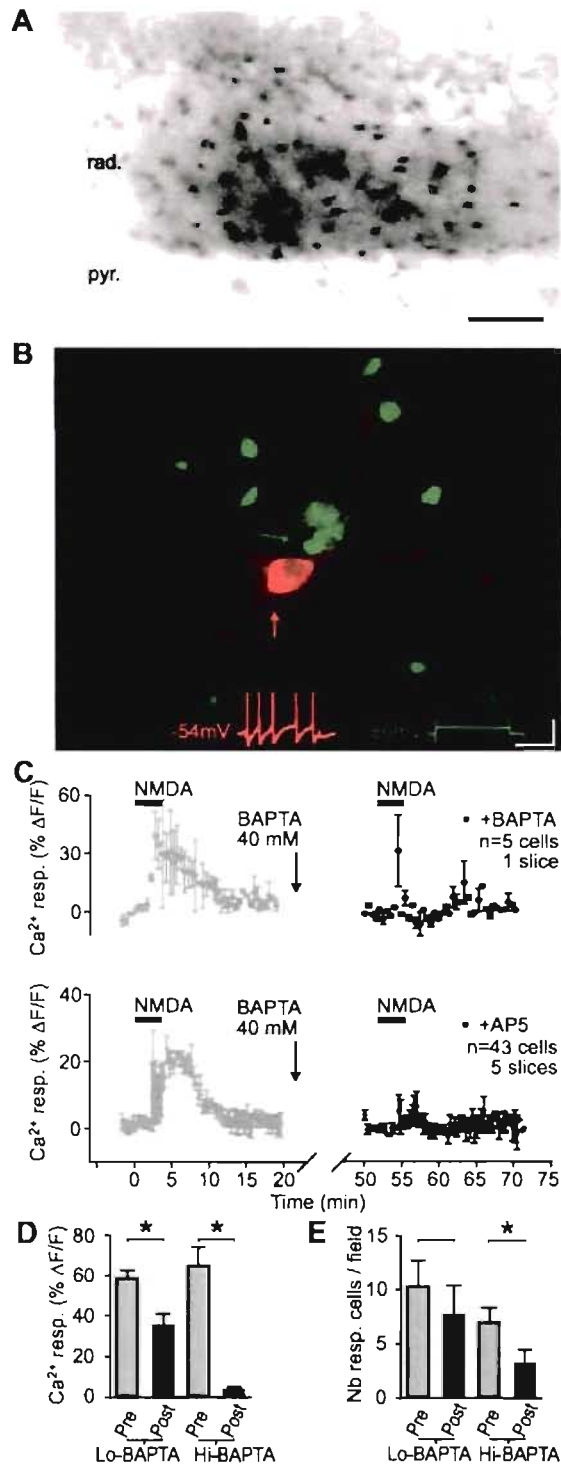


Figure 3. Dialysis of BAPTA in glial cells blocked the Ca²⁺ rise induced by NMDA. A, Syncytium of glial cells in CA1 stratum radiatum (rad.) labeled with biocytin following whole cell recording of a single glial cell with a patch pipette

containing BAPTA (40 mM) and NMDA application. Calibration bar 50 μm . B, Syncytium of glial cells (green) in CA1 stratum radiatum labeled with Oregon Green BAPTA following whole cell recording from a single glial cell (green arrow) and NMDA application. An adjacent interneuron (red) was subsequently recorded in whole-cell mode with Alexa594 in the patch pipette solution (red arrow). Insets show current-clamp recordings from the glial cell (green trace) and the interneuron (red trace) in response to the same depolarizing current step (scale bars 200 ms and 20 mV). C, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a single slice (upper panel, n=5 cells) and for all slices (lower panel, n=43 cells, 5 slices) before, during and after NMDA bath application (bars) in control (t=0-20 min, gray) and following intracellular dialysis of 40 mM BAPTA into glial cells (t=50-70 min, black, paired experiments). BAPTA was dialyzed during whole cell patch recording from a single glial cell for the period indicated by the break in the time axis. This period was necessary to allow BAPTA diffusion in the glial syncytium. After BAPTA dialysis (t=50-70min), the glial Ca^{2+} rise induced by NMDA was significantly reduced (Student's paired t-test, $p < 0.01$). D, Bar graphs showing the amplitude of NMDA-induced glial Ca^{2+} responses in control (pre-BAPTA dialysis in glial cells; shown as Pre in gray) and following BAPTA dialysis in glial cells (with either 0.1 mM BAPTA (Lo-BAPTA) or 40 mM of BAPTA (Hi-BAPTA) in pipette, shown as Post in black). E, Bar graphs showing the number of glial cells responding to NMDA in control (pre) and following dialysis of 0.1 mM BAPTA (Lo-BAPTA) or 40 mM BAPTA (Hi-BAPTA).

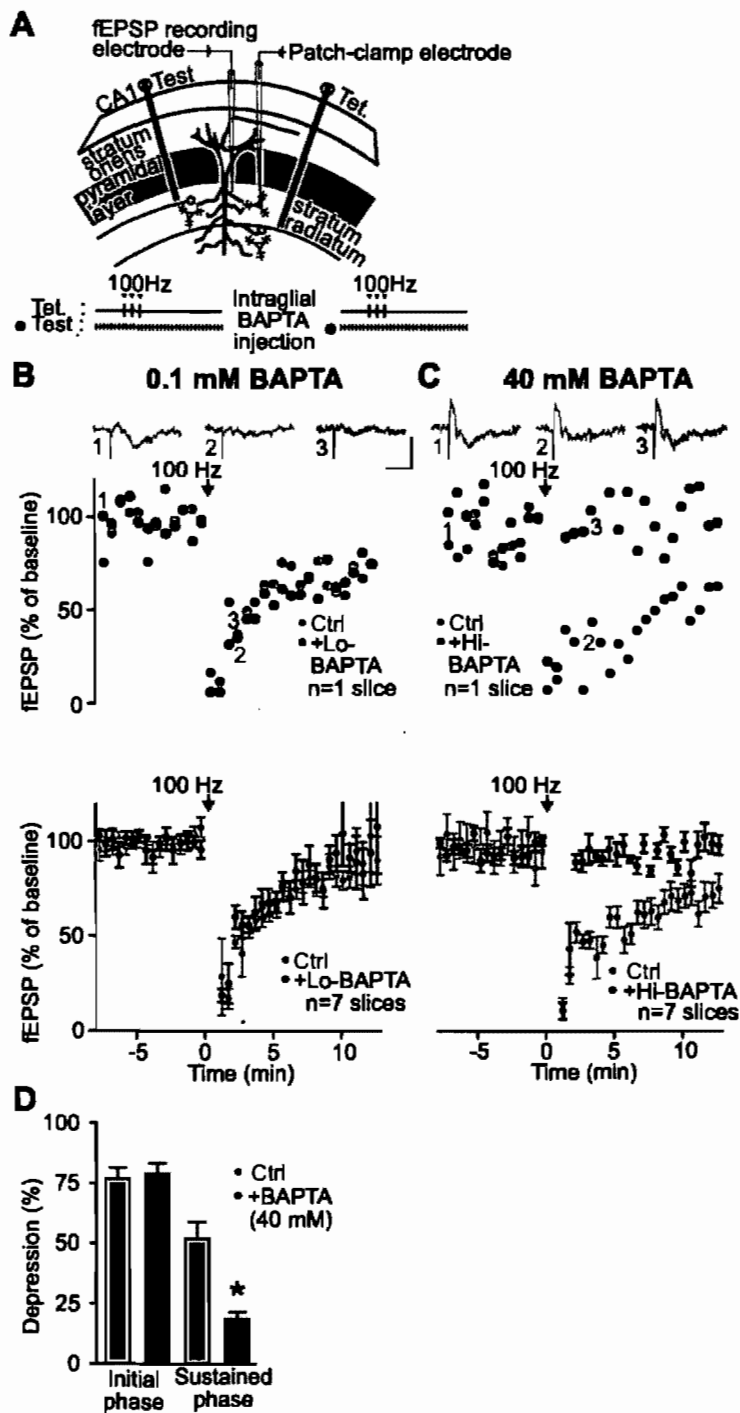


Figure 4. Blockade of heterosynaptic depression by BAPTA dialysis in glial cells. A, Schematic representation of area CA1 in a rat hippocampal slice, showing positions of two stimulating electrodes (Test and Tet.), a single fEPSP recording electrode placed in the stratum radiatum and a single whole cell patch-clamp

electrode recording from a glial cell. The experimental protocol is illustrated at the bottom. B, Data from a representative slice (upper panel) and for all slices (lower panel, n=7 slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after tetanic stimulation of an independent pathway (arrow, trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals) in paired control experiments (gray) and following whole cell dialysis of 0.1 mM BAPTA in the glial syncytium (black). Dialysis of 0.1 mM BAPTA in glial cells did not affect tetanization-induced heterosynaptic depression (Student's paired t-test, $p>0.3$). Upper panel insets show examples of fEPSPs before (1) and during heterosynaptic depression in control (2) and following dialysis of 0.1 mM BAPTA (3) (bars 1 mV and 20 ms). C, Data from a single slice (top panel) and for all slices (lower panel, n=7 slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after tetanic stimulation of an independent pathway (arrow, trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals) in paired control experiments (gray) and following whole cell dialysis of 40 mM BAPTA in the glial syncytium (black). Note that heterosynaptic depression was obliterated in the presence of high concentration of the Ca^{2+} chelator. Dialysis of 40 mM BAPTA in glial cells did not affect the initial phase but reduced significantly the sustained phase of the tetanization-induced heterosynaptic depression (Student's paired t-test, $p<0.01$). Upper panel insets show examples of fEPSPs before (1) and during heterosynaptic depression in control (2) and in the presence of high concentration of intragial BAPTA (3). D, Bar graphs showing the amplitude of the initial and the sustained phase of heterosynaptic depression induced by tetanic stimulation in control (gray) and following dialysis of 40 mM BAPTA (black).

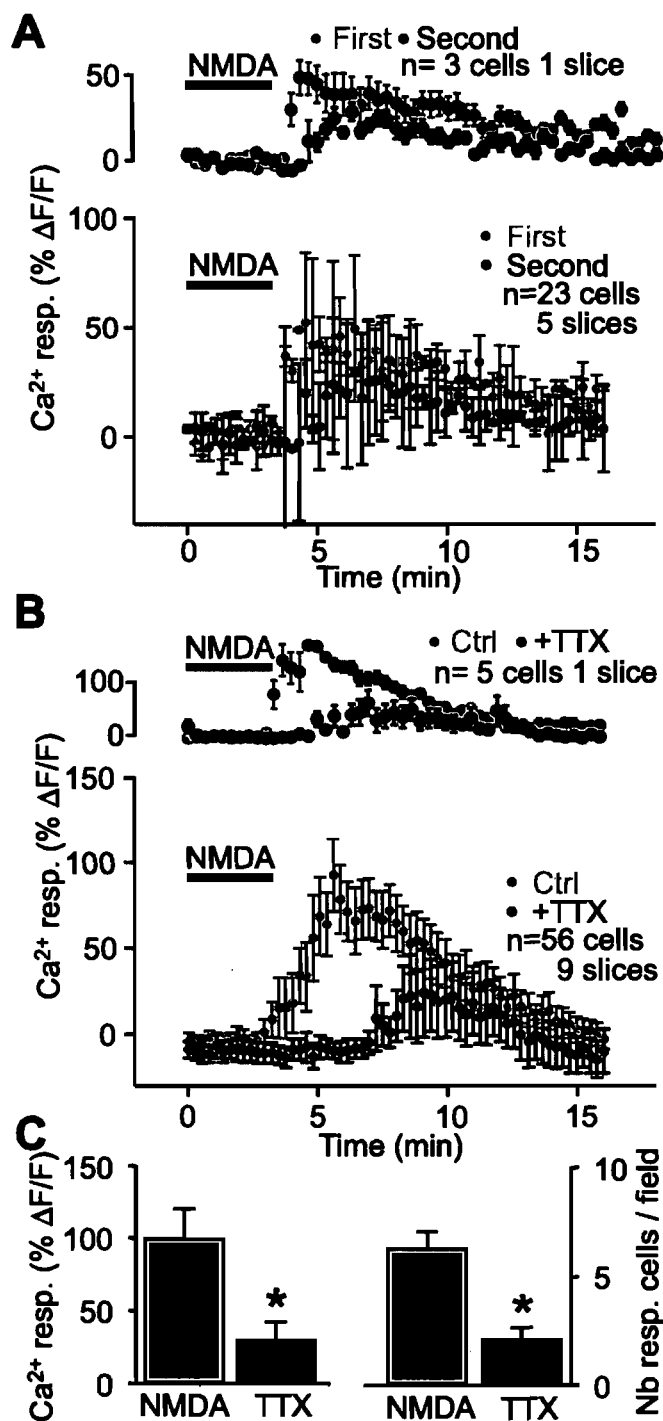


Figure 5. Indirect Ca²⁺ activation of glial cells during NMDA-induced depression. A, Relative increase (mean ± S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a representative single slice (top panel, n=3 cells) and for all slices (lower panel, n=23 cells, 5 slices) before, during and after two consecutive NMDA bath

applications (bar), showing a small rundown in Ca²⁺ response to the second NMDA application (first, gray and second, black; paired experiments). B, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a representative slice (upper panel, n=5 cells) and for all slices (lower panel, n=56 cells, 9 slices) before, during and after NMDA bath application (bar) in control (gray) and in the presence of TTX (1 μ M, black; paired experiments). The rise of Ca²⁺ in glial cells elicited by NMDA (25 μ M) was significantly reduced and delayed in the presence of TTX. C, Bar graphs depicting the peak amplitude of glial Ca²⁺ responses and the number of responsive glial cells induced by NMDA in control (gray) and in TTX (black). Note the significant reduction in the amplitude of the responses and in the percentage of responsive cells (Student's paired t-test, p<0.001).

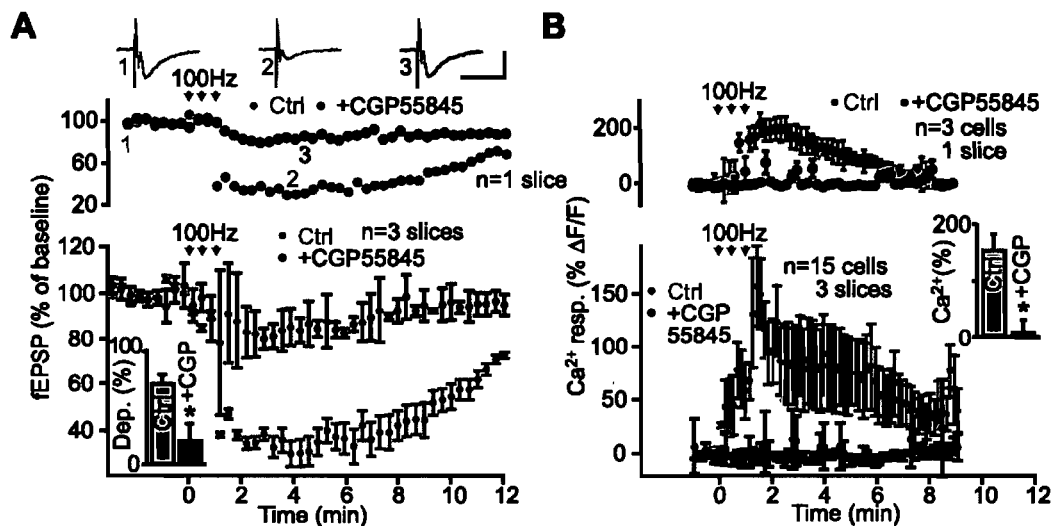


Figure 6. GABAB receptor activation is necessary for heterosynaptic depression. A, Data from a single slice (top panel,) and for all slices (lower panel, n=3 slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after tetanic stimulation of an independent pathway (arrows, trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals) in paired control experiments (gray) and in the presence of the GABAB receptor antagonist CGP55845 (2 μ M black). Summary bar graph (insert) showing that heterosynaptic depression was reduced significantly by the GABAB receptor antagonist (Student's paired t-test, $p < 0.001$). Top panel insets show examples of fEPSPs before (1) and during heterosynaptic depression in control (2) and in the presence of CGP55845 (3) (scale bars 1 mV and 25 ms). B, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a single slice (top panel, n=3 cells, same slice as in A) and for all slices (lower panel, n=15 cells, 3 slices) before, during and after tetanic stimulation in control and in the presence of CGP55845 (2 μ M, same experiments as in A). Summary bar graph (insert) illustrating that the rise of Ca²⁺ in glial cells elicited by tetani was blocked by CGP55845 (Student's paired t-test, $p < 0.01$).

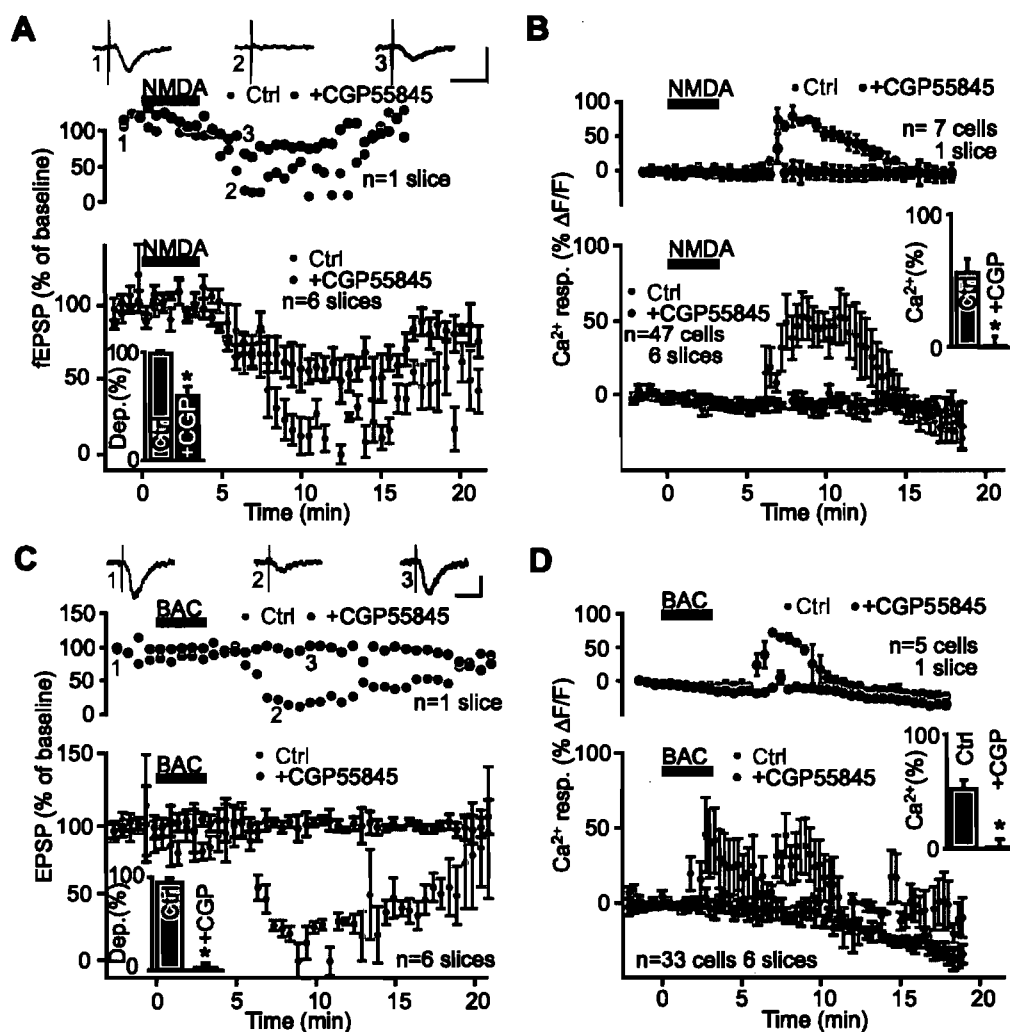


Figure 7. GABAB receptor activation is involved in NMDA and baclofen-induced depression. A, Data from a single slice (top panel) and for all slices (bottom panel, $n=6$ slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after NMDA bath application ($25 \mu\text{M}$; 3 minutes, bar) in paired control experiments (gray) and in the presence of the GABAB receptor antagonist CGP55845 ($2 \mu\text{M}$, black). Summary bar graph (insert) illustrating the significant reduction of NMDA-induced depression by CGP55845 (Student's paired t-test, $p < 0.01$). Upper panel insets show examples of fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence of CGP55845 (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). B, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a single slice (upper panel, $n=7$ cells) and for all

slices (lower panel, n=47 cells, 7 slices) before, during and after NMDA bath application (25 μ M) in control (gray) and in the presence of CGP55845 (2 μ M, black). Summary bar graph (insert) illustrating the blockade of NMDA-induced glial Ca²⁺ responses by CGP55845 (Student's paired t-test, p<0.001; same experiments as in A). C, Data from single slice (upper panel) and for all slices (lower panel, n=6 slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after bath application of the GABAB receptor agonist baclofen (20 μ M; 3 minutes, bar) in paired control experiments (gray) and in the presence of CGP55845 (2 μ M, black). Bar graph (insert) depicting the baclofen-induced reduction in the fEPSP amplitude (gray) was blocked by the GABAB receptor antagonist CGP55845 (black; Student's paired t-test, p<0.01). Upper panel insets show examples of fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence of CGP55845 (3) (scale bars 0.2 mV and 20 ms). D, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a single slice (upper panel, n=5 cells) and for all slices (lower panel, n=33 cells, 6 slices) before, during and after baclofen bath application (20 μ M) in control (gray) and in the presence of 2 μ M CGP55845 (black, paired experiments; same experiments as in C). Bar graph (insert) illustrating the average baclofen-induced Ca²⁺ responses in control and in the presence of CGP55845. Glial Ca²⁺ responses were prevented by the GABAB receptor antagonist (Student's paired t-test, p<0.01).

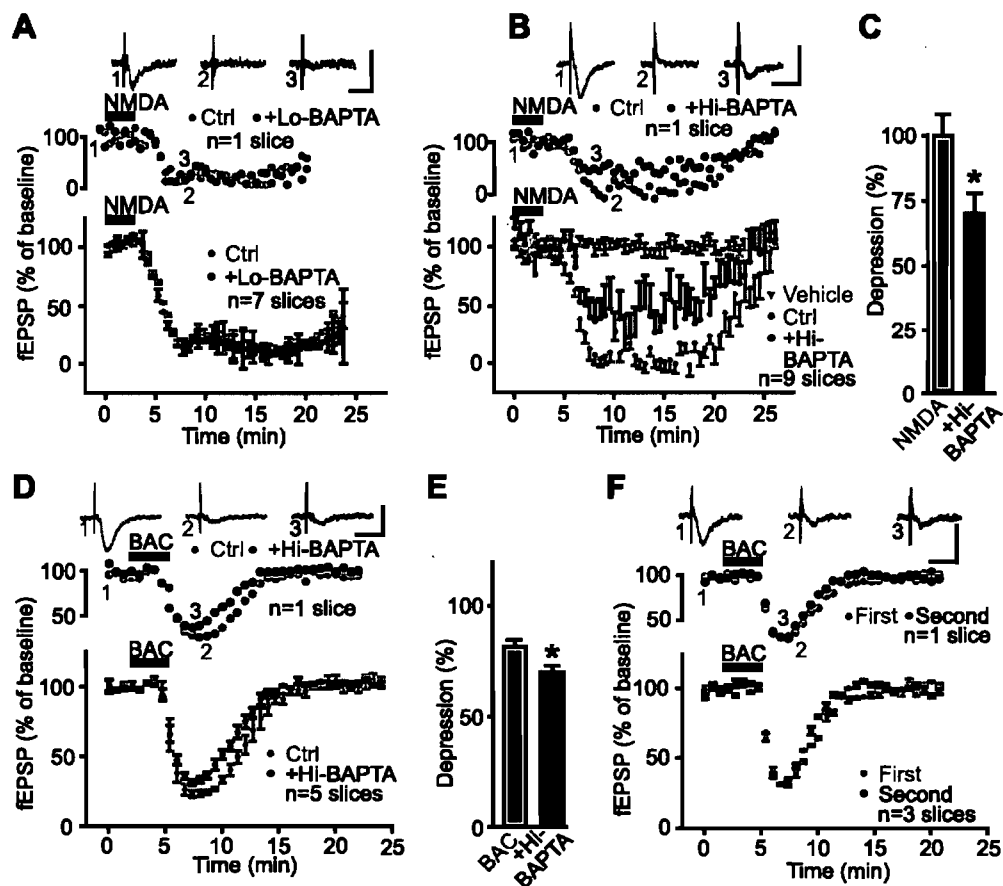


Figure 8. Effects of glial BAPTA dialysis on NMDA and baclofen-induced depression. A, Data from a single slice (top panel) and for all slices (lower panel, n=7 slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after NMDA bath application (25 μ M) in paired control experiments (gray) and following 0.1 mM BAPTA dialysis into glial cells (black). Top panel insets show examples of fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence 0.1 mM of BAPTA in the glial syncytium (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). The presence of 0.1 mM BAPTA in glial cells did not affect NMDA-induced depression (Student's paired t-test, $p > 0.3$). B, Data from single slice (top panel) and for all slices (lower panel, n=9 slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after NMDA bath application (25 μ M) in paired control experiments (gray) and following 40 mM BAPTA dialysis into glial cells (black). Insets show examples of fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence 40 mM of

intraglial BAPTA (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). Dialysis of 40 mM BAPTA in glial cells reduced the NMDA-induced depression. fEPSP amplitude expressed as percentage of baseline were unchanged before, during and after vehicle application, and whole recording from a glial cell with a solution without BAPTA (gray triangles). C, Bar graphs showing percentage of NMDA-induced depression in control (gray) and in the presence of BAPTA (40 mM) in the glial syncytium (black). Note the significant reduction of the peak of NMDA-induced depression by the glial BAPTA (Student's paired t-test, $p < 0.02$). D, Data from a single slice (upper panel) and for all slices (lower panel, $n=5$ slices) illustrating changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after baclofen bath application (20 μ M) in paired control experiments (gray) and following 40 mM BAPTA dialysis into the glial syncytium (black). Insets show examples of fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence 40 mM of intraglial BAPTA (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). E, Bar graphs showing percentage of baclofen-induced depression in control (gray) and in the presence of BAPTA (40 mM) in the glial syncytium (black). Note the reduction in the baclofen-induced depression (Student's paired t-test, $p < 0.001$). F, Data from a single slice (upper panel) and for all slices (lower panel, $n=3$ slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after two consecutive baclofen bath applications (paired experiments; 20 μ M, bar). Insets show corresponding fEPSPs before (1) and during (2, 3) synaptic depression (scale bars 0.5 mV and 20 ms).

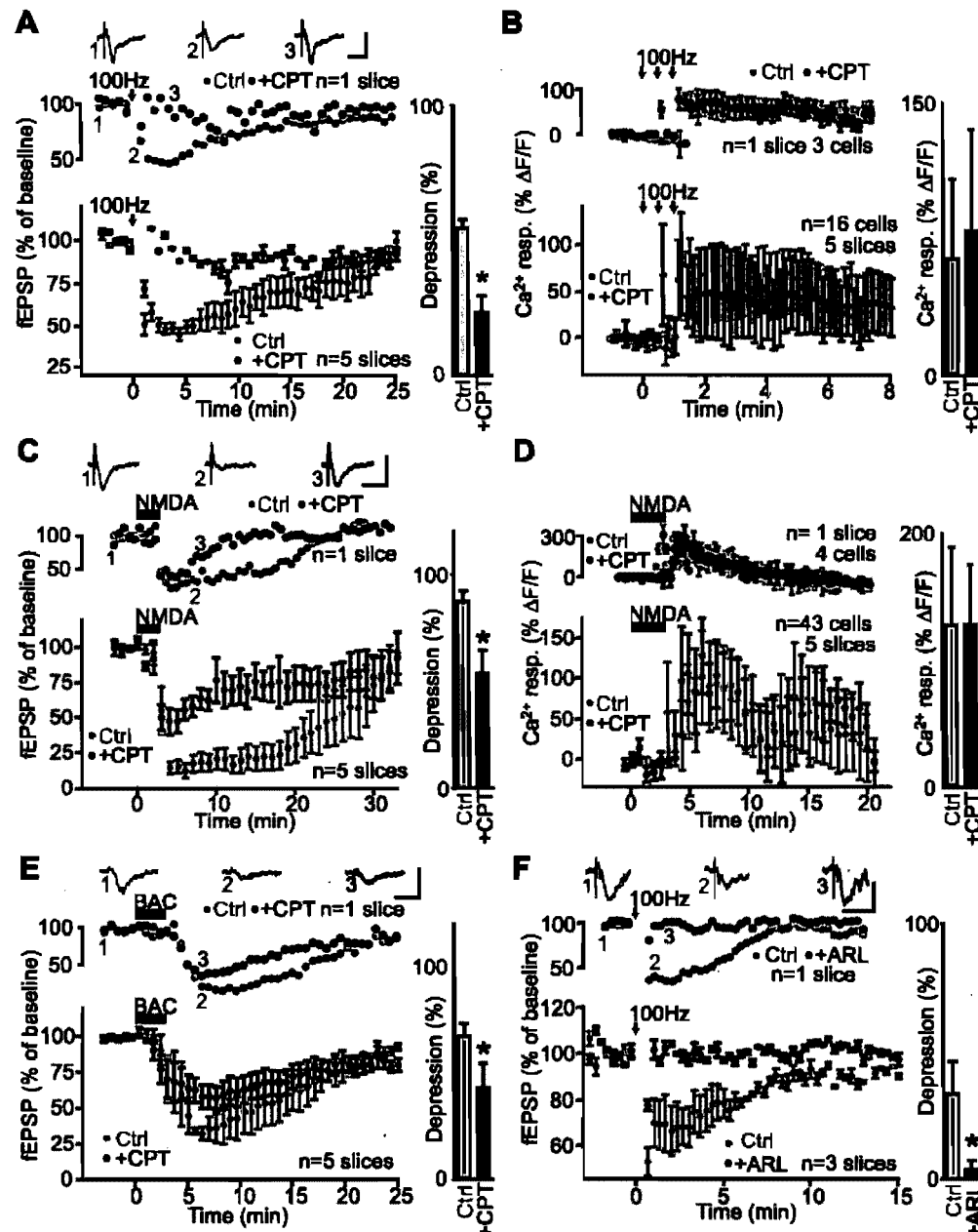
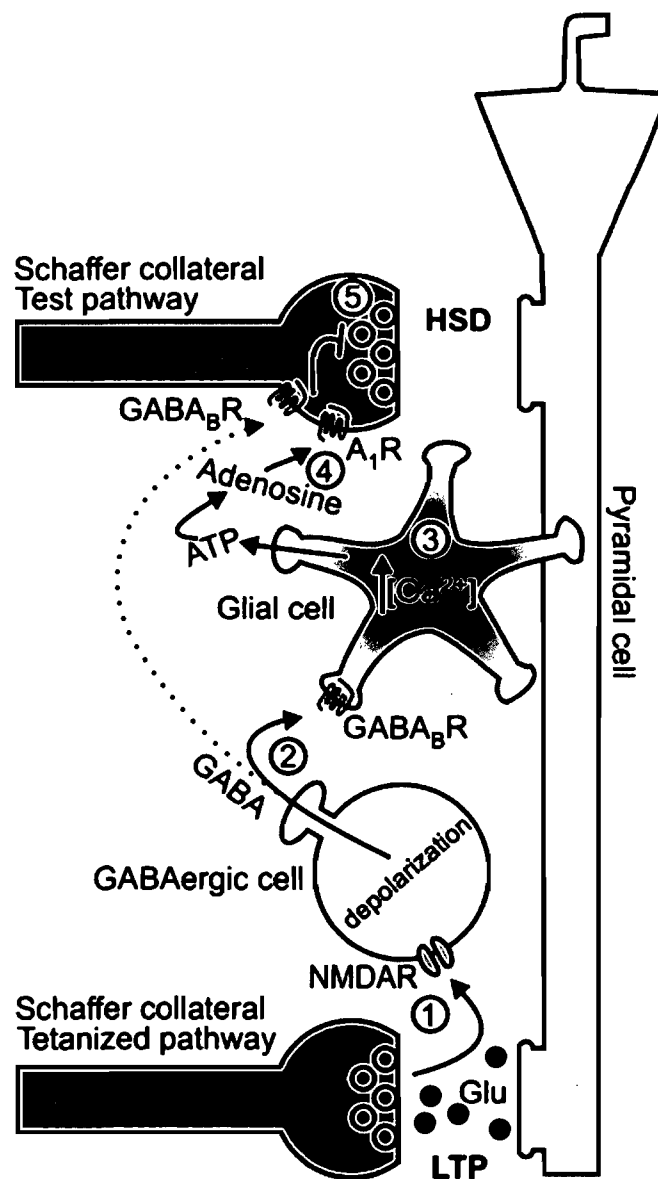


Figure 9. Adenosine A1 receptors mediate heterosynaptic depression but are not involved in glial activation. A, Data from single slice (top panel) and for all slices (lower panel, n=5 slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before and after tetanic stimulation of an independent pathway (arrows, 3 trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals) in paired control experiments (gray) and in the presence of the A1 receptor antagonist CPT (2 μ M, black). Insets show examples of fEPSPs before (1) and during heterosynaptic depression in control (2)

and in the presence of CPT (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). Bar graph (right) showing that heterosynaptic depression was significantly reduced by the A1 receptor antagonist (Student's paired t-test, $p < 0.05$). B, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a single slice (top panel, $n=3$ cells) and for all slices (lower panel, $n=16$ cells, 5 slices) before, during and after tetanic stimulation (arrows, 3 trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec interval) showing a calcium rise in control (gray) and in the presence of 2 μ M CPT (black, paired experiments). Bar graph (right) showing that the A1 receptor antagonist had no effect on glial Ca^{2+} responses evoked by tetanic stimulation (Student's paired t-test, $p > 0.3$). C, Data from a single slice (upper panel) and for all slices ($n=5$ slices) illustrating changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after NMDA bath application (25 μ M) in paired control experiments (gray) and in the presence of CPT (2 μ M, black). Insets show corresponding fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence of CPT (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). Bar graph (right) indicating that NMDA-induced depression was reduced significantly by the A1 receptor antagonist (Student's paired t-test, $p < 0.05$). D, Relative increase (mean \pm S.E.M.) in fluorescence for glial cells in a single slice (upper panel, $n=4$ cells) and for all slices (lower panel, $n=43$ cells, 5 slices) before, during and after NMDA bath application (25 μ M) showing a calcium rise in control (gray) and in the presence of 2 μ M CPT (black, paired experiments). Bar graph (right) showing that the A1 receptor antagonist had no effect on the NMDA-evoked glial Ca^{2+} responses (Student's paired t-test, $p > 0.2$). E, Data from a single slice (upper panel) and for all slices (lower panel, $n=5$ slices) showing changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after baclofen bath application (20 μ M) in control (gray) and in the presence of CPT (2 μ M, paired experiments). Insets show fEPSPs before (1) and during synaptic depression in control (2) and in the presence of CPT (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). Bar graph (right) illustrating that baclofen-induced depression was significantly reduced by the A1 receptor antagonist (Student's paired t-test, $p < 0.05$). F, Data from single slice (upper panel)

and for all-slices (lower panel, n=3 slices) displaying changes in fEPSP amplitude as percentage of baseline before, during and after tetanic stimulation of an independent pathway (arrows, 3 trains at 100 Hz for 1 sec, 30 sec intervals) in control (gray) and in the presence of ectonucleotidase inhibitor ARL67156 (100 μ M, black, paired experiments). Insets show fEPSPs before (1) and during heterosynaptic depression in control (2) and in the presence of ARL67156 (3) (scale bars 0.5 mV and 20 ms). Bar graph (right) illustrating the significant reduction of heterosynaptic depression by ARL67156 (Student's paired t-test, $p < 0.05$).

4.1.8 SUPPLEMENTAL DATA



Supplemental figure 1. Model of interactions between GABAergic cells and glial cells in heterosynaptic depression. High frequency stimulation of Schaffer collaterals in the tetanized pathway (bottom, LTP) activates GABAergic cells through NMDA receptors (1). GABA released locally activates GABAB receptors on glial cells (2). Activation of GABAB receptors elicits a Ca²⁺ rise in glial cells (3). This GABAB-induced Ca²⁺-mediated activation of glial cells induces the

release of ATP (4) which is degraded into adenosine, giving rise to A1 receptor-mediated presynaptic inhibition of Schaffer collaterals in the test pathway (5), and heterosynaptic depression (HSD). This glial-mediated phenomenon occurs in parallel, but with a slower time course, with the direct presynaptic GABAB modulation of glutamatergic synapses by GABAergic cells (dotted line).

5 DEUXIÈME CHAPITRE DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Ce chapitre comporte la publication suivante :

Alexandre Serrano, Richard Robitaille, Jean-Claude Lacaille. *Astrocyte subtype-specific modulation by NMDA in mouse hippocampus*. Article soumis pour publication à la revue *Glia*.

Dans l'hippocampe, le récepteur NMDA est un récepteur au glutamate que l'on croit important pour la plasticité synaptique et les mécanismes cellulaires de la mémoire. Jusqu'à récemment, les récepteurs NMDA ont été considérés uniquement comme une composante neuronale, mais certaines données suggèrent que les astrocytes de l'hippocampe pourraient aussi être activés par le glutamate via les récepteurs NMDA. Dans cette étude nous avons étudié l'activation spécifique par le NMDA de deux populations différentes d'astrocytes, les cellules GluT et GluR, provenant de souris transgéniques GFAP-GFP. Nos données suggèrent que le NMDA induit une dépolarisation membranaire des cellules GluT qui ne nécessite pas d'élévation calcique mais dépend d'une entrée de Ca^{2+} . De plus, la dépolarisation induite par le NMDA dans les astrocyte GluT engage à la fois une voie directe du NMDA et une voie indirecte sensible à la TTX qui active les transporteurs au glutamate et les récepteurs GABA_B. Cette activation indirecte des astrocytes GluT régule aussi le couplage de ces cellules. Nos données sur les astrocytes GluR suggèrent que la dépolarisation induite par le NMDA dépend d'une entrée de Ca^{2+} mais ne nécessite pas d'élévation calcique ni d'activation de transporteurs au glutamate, de récepteurs GABA_A ou GABA_B. Ces travaux révèlent que le NMDA active les astrocytes de l'hippocampe et le réseau glial par des mécanismes qui sont spécifiques au sous-type cellulaire.

5.1 ASTROCYTE SUBTYPE-SPECIFIC MODULATION BY NMDA IN MOUSE HIPPOCAMPUS.

Alexandre Serrano, Richard Robitaille, Jean-Claude Lacaille

Centre de Recherche en Sciences Neurologiques et Département de physiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec
CANADA H3C 3J7.

Running title : Effects of NMDA on astrocytes

Figures: 11; Tables: 0.

Number of words : abstract 202, intro 407, discussion 1010, total 7354.

Text pages: 27

Key words: astrocyte, GluT, GluR, NMDA.

Corresponding author:

Dr. Jean-Claude Lacaille

Département de physiologie, Faculté de médecine,
Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville,
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

E-mail

Phone: (514) 343-6111 poste 4396

5.1.1 ABSTRACT

In the hippocampus, the NMDA receptor is thought to be an important glutamate receptor involved in synaptic plasticity and in memory processes. Until recently, NMDA receptors have been considered solely as neuronal components, but some evidence suggests that astrocytes in the hippocampus also could be activated by NMDA applications. Here we show that two different populations of astrocytes from GFAP-GFP transgenic mice, GluT and GluR cells, are activated by NMDA applications in a cell-type specific manner. Our data suggests that NMDA induces a membrane depolarization in GluT cells that is not dependent on an astrocytic Ca^{2+} rise, but partially involves a Ca^{2+} entry. Additionally, NMDA-induced depolarization of GluT astrocyte involves both a direct effect of NMDA and indirect, TTX-dependent pathways activating glutamate transporters and GABA_B receptors. Furthermore, indirect NMDA-induced activation of GluT astrocytes regulates the level of gap junction coupling only between GluT cells. In contrast, our data indicate that NMDA-induced depolarizations in GluR cells do not require a Ca^{2+} rise in the astrocyte but are mediated directly by Ca^{2+} entry and are independent of glutamate transporters, GABA_B and GABA_A receptors. Our findings reveal that NMDA activates hippocampal astrocytes and the glial network through heterogeneous mechanisms that are cell-type specific.

5.1.2 INTRODUCTION

Increasing number of evidence indicates that glial cells are critical for the transmission of information in the brain through their involvement in synaptic

transmission and plasticity (Auld and Robitaille, 2003). Astrocytes detect the release of neurotransmitters and, in turn, they release gliotransmitters that modulate information processing (Araque et al., 1998b; Schell et al., 1995; Zhang et al., 2003). Hence, glial cells, with the pre- and postsynaptic neuronal elements, form a tripartite synapse and are central to information processing.

One important aspect of the tripartite synapse is the involvement of glutamatergic NMDA receptors. For instance, astrocytes can release the co-agonist of NMDA receptors D-serine (Panatier et al., 2006; Schell et al., 1995) and contribute to glutamate uptake by transporters (Bergles and Jahr, 1997; Bergles and Jahr, 1998; Huang and Bergles, 2004; Oliet et al., 2001; Tong and Jahr, 1994; Turecek and Trussell, 2000). There is also some evidence that astrocytes can release glutamate directly to activate neuronal NMDA receptors (Araque et al., 1998b; Bezzi et al., 1998; Parri et al., 2001; Pasti et al., 1997) which can influence network synchronization (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004). Furthermore, astrocytes contribute to some forms of synaptic plasticity involving NMDA receptors, such as potentiation of inhibitory synaptic transmission (Kang et al., 1998) and heterosynaptic depression of excitatory synapses (Li et al., 2004; Manzoni et al., 1994; Serrano et al., 2006).

However, notwithstanding the evidence of NMDA-dependent astrocytic regulation of synaptic functions, activation of astrocytes by NMDA is still ill-defined. For instance, NMDA effects on astrocytes are inconsistent and variable with some

hippocampal astrocytes showing NMDA-induced currents (Steinhauser et al., 1994) and Ca^{2+} rises (Latour et al., 2001; Porter and McCarthy, 1995; Serrano et al., 2006), sensitive to TTX in some cells but not in others. Additionally, freshly isolated hippocampal astrocytes showed no NMDA induced currents (Seifert and Steinhauser, 1995) while others reported NMDA-induced currents or Ca^{2+} elevations in astrocytes (Lalo et al., 2006; Latour et al., 2001; Porter and McCarthy, 1995; Schipke et al., 2001; Serrano et al., 2006). Hence, as a whole, these observations reveal a diversity of NMDA sensitivity in astrocytes.

One possible explanation is that there are diverse populations of astrocytes that are differently activated by NMDA. Interestingly, it has been shown that different populations of astrocytes coexist in the hippocampus (Bordey and Sontheimer, 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Steinhauser et al., 1994). These cells differ in their AMPA receptor subunit expression and show distinctive coupling capabilities (Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004). It is now established that GluT or linear astrocytes lack AMPA receptors but show extensive coupling with other astrocytes while GluR or rectifying astrocytes have glutamate receptors but lack coupling (Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004). Hence, an interesting possibility is that diversity of NMDA-mediated actions in astrocytes is due to heterogeneous cell-type specific effects.

We found that NMDA activates hippocampal astrocytes in a subtype specific manner through different mechanisms. This suggests that NMDA receptors are not

only important for neuronal function but also important for activation of astrocytes.

5.1.3 MATERIALS AND METHODS

5.1.3.1 HIPPOCAMPAL SLICE PREPARATION

All experiments were performed in accordance with institutional guidelines at Université de Montréal for maintenance and care of animals. Transverse hippocampal slices were obtained from 10–18 day old male GFAP-GFP transgenic mice (JAX Mice, USA). Mice were anaesthetized with halothane and decapitated with a guillotine. The brain was rapidly excised and placed in cold (4°–5°C) oxygenated (95% O₂ /5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃ and 10 glucose. 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 (Leica Instruments). The CA1 region was isolated from CA3 inputs by a cut in between the two regions. Slices were maintained at room temperature for at least 30 min before being transferred to a recording chamber where they were perfused with oxygenated ACSF.

5.1.3.2 ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDINGS OF ASTROCYTES

Whole-cell current-clamp recordings were obtained from fluorescent GFP-labeled astrocytes in stratum radiatum of CA1 region. Astrocytes were visualized using a 60X water immersion objective (0.90 N.A.) on an upright microscope (Olympus America Inc., Melville, NY, U.S.A.) equipped with differential interference

contrast optics (DIC) and infrared illumination (IR) video camera (Cohu, San Diego, CA, U.S.A.). Recordings were performed using an Axopatch 200B amplifier with a Digidata 1200 using pClamp9 software (Axon Instruments, Foster City, CA, U.S.A.). Pipettes were pulled from borosilicate glass (1 mm O.D., A-M Systems) and filled with (in mM): 145 K-methylsulfate, 1MgCl₂, 8 NaCl, 2 ATP, 0.4 GTP, 10 HEPES, 0.5 mM EGTA and 0.15% biocytin, titrated with KOH to pH 7.2 and adjusted to 280 mOsm (electrode resistance: 8 M Ω). Signals were filtered with a low pass filter at 1 KHz and digitized at 2 KHz. After establishment of a stable whole-cell patch clamp recording, the whole-cell current-voltage profile of each cell was recorded using a ramp voltage command from -150 to +100 mV (750 ms duration; holding potential -70 mV). Recordings were kept only when membrane input resistance, resting membrane potential and current-voltage profiles were stable during the experiments. GluR and GluT types of astrocyte were identified based on the rectification index of the whole cell current-voltage relationship (Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004). The rectification index (Rx) was derived from the current-voltage (I-V) profile as the ratio of the slope of the current between -100mV and -110mV (g₋₁₀₀) over the slope of the current between 20mV and 30 mV (g₂₀).

Bath application of NMDA was used to activate astrocytes. A first control NMDA-induced depolarization was recorded. Eighteen minutes after washout, NMDA-induced membrane depolarization was again measured in the same cell in

the presence of blockers. Blockers were applied via bath perfusion 15 minutes prior to testing (unless otherwise noted): tetrodotoxin (TTX, 1 μ M), (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl] (phenylmethyl) phosphinic acid (CGP55845, 2 μ M) and bicuculline (BIC, 25 μ M). NMDA-induced effects were reproducible, with no major change in amplitude or kinetics of the depolarizations. Hence, experiments were performed paired on the same slices, in control condition and in the presence of blockers.

For experiments using the Ca^{2+} chelator 1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetra-acetic acid tetrapotassium salt (BAPTA), K-methylsulfate was omitted from the intracellular patch solution. During BAPTA diffusion into the cells, we did not observe any variation in membrane potential, input resistance and current profile of the recorded cell. In this series of experiments, controls were performed in different cells. BAPTA was dialyzed specifically in glial cells using whole-cell recordings for 15 minutes prior to NMDA application.

5.1.3.3 CONFOCAL MICROSCOPY AND Ca^{2+} IMAGING

Hippocampal slices were obtained from FVB/N non-GFP mice. Cells were loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo4-AM (Molecular Probes) as described previously (Serrano et al., 2006). Briefly, slices were incubated for 35-45 min at room temperature in oxygenated ACSF containing 50 μ M fluo4-AM and 0.5% dimethyl sulphoxide. After the incubation period, slices were returned to oxygenated ACSF at room temperature. Individual slices were then recorded under

a laser scanning confocal microscope (BioRad MRC-600). The 488 nm wavelength of an argon ion laser attenuated to 1% of maximal intensity was used for excitation. Emitted fluorescence was filtered at 515 nm through a long-pass filter. A 60X water-immersion objective was used (Olympus, 0.90 N.A.). Images (512 x 768; 8-bit) were acquired at 0.5 Hz and analyzed off-line using ImageJ (NIH). Changes in fluorescence (ΔF), were measured as relative changes from baseline fluorescence and expressed as $\% \Delta F/F = [(F_{\text{post}} - F_{\text{rest}})/F_{\text{rest}}] \times 100$.

5.1.3.4 GLIAL SYNCYTIUM

After whole-cell recordings, slices containing biocytin-filled cells were fixed for 12h at 4°C in 4% paraformaldehyde and 0.1 M phosphate buffer. Slices were then washed in 0.1 M phosphate buffer and processed using the Vectastain ABC kit (Vecta Laboratories, Burlingame, CA), followed by nickel-intensification as previously described (Woodhall et al., 1999). Sections were mounted in D.P.X. medium (distyrene, plasticizer, and xylene mixture) and examined under a light microscope. Localization, field of view, focus and depth of field were adjusted to match the conditions of the whole-cell recording. We counted the number of visible labeled cells under a microscope equipped with a 40X objective (Nikon, 0.75 N.A.).

5.1.3.5 STATISTICAL ANALYSIS

For experiments where control and drug conditions were performed on the same cells (TTX, CGP55845, bicuculline and low- Ca^{2+}), the statistical difference between groups was tested using Student's paired *t* test. When control and drug

conditions were performed on different cells (BAPTA, GluT vs GluR) Student's unpaired *t* tests were used. In the coupling experiments, where three conditions are evaluated, an ANOVA/Newman Keuls test was used to compare each pair of conditions. In all cases, the level of significance was set at $p < 0.05$. All measures are expressed as mean \pm S.E.M.

5.1.4 RESULTS

5.1.4.1 IDENTIFICATION OF ASTROCYTES.

A possible source of discrepancy reported for NMDA modulation of astrocytes may be due to the diversity of these cells in hippocampus. Hence, we first characterized astrocytes in the stratum radiatum of the CA1 region of acute hippocampal slices from transgenic mice expressing green fluorescence protein (GFP) under the control of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter (Zhuo et al., 1997). Taking advantage of GFP cell labelling, astrocytes could be unequivocally distinguished from neurons or other cell types (Figs. 1A,B). Whole-cell recordings were obtained from GFP-labelled astrocytes using DIC optics coupled to infrared illumination. In voltage clamp mode, astrocytes always lacked action potentials following depolarization (data not shown). After establishment of a stable whole-cell recording, the current-voltage relation of each cell was evoked by a ramp voltage command. In agreement with previous observations (Blomstrand et al., 2004; Bordey and Sontheimer, 1998; D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al., 2003; Steinhauser et al., 1994; Walz, 2000a; Zhou et al., 2006), two different current-voltage profiles were

found: “linear” and “rectifying” (Figs. 1C,D). A rectification index was calculated to distinguish the two types of current-voltage profiles. As a result, cells were separated into two groups based on the intensity of the GFAP-GFP fluorescence, the profile and rectification index of the current-voltage relation, and the presence of cell-coupling (see below). The first group, consisting of GluT astrocytes (Matthias et al., 2003), showed a nearly ohmic (linear) current-voltage profile characterized by a mean rectification index of 0.97 ± 0.02 (n=25 cells, Fig. 1C). These cells had a small cell body, were brightly fluorescent and showed visible GFP-labelled processes. Others have also referred to these cells as “linear” (Blomstrand et al., 2004; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et al., 2006) or “passive” glia (Zhou et al., 2006). The second group of cells, consisting of GluR astrocytes (Matthias et al., 2003), showed an outwardly rectifying current profile with a rectification index of 3.40 ± 0.54 (n=25 cells, Fig. 1D). These cells also had a small cell body, but showed dimmer GFP-labelling than GluT cells, and have sometimes been referred to as “outward rectifying glia” (Zhou et al., 2006).

5.1.4.2 NMDA-INDUCED Ca^{2+} RESPONSES IN ASTROCYTES.

NMDA-induced Ca^{2+} rises have been reported from hippocampal CA1 astrocytes (Latour et al., 2001; Porter and McCarthy, 1995; Serrano et al., 2006) but the subtype of astrocytes involved was not analyzed previously. We used whole-cell patch clamp recordings and current-voltage profile analysis combined with confocal imaging of fluorescent Ca^{2+} indicator (Fluo4-AM) to

identify the subtype of astrocytes activated by NMDA. For these experiments, non-GFP mice were used and the two types of astrocytes were distinguished with DIC and infrared optics by their particular size (10-30 μm), stellate morphology and electrophysiological properties (low resting membrane potential, absence of action potential and rectification index) (Latour et al., 2001; Serrano et al., 2006).

As previously reported (Latour et al., 2001; Porter and McCarthy, 1995; Serrano et al., 2006), bath application of NMDA (25 μM , 2 min) induced a large increase in Fluo4 fluorescence in numerous glial cells of the stratum radiatum (Figs. 2A,B). Using both fluorescence and DIC optics, whole cell recordings were obtained under visual guidance from responsive cells. Two different types of Ca^{2+} responses were observed. The first type was prolonged and had a mean delay of 3.8 ± 0.2 minutes from NMDA onset to maximal Ca^{2+} rise. The current-voltage profile of these Ca^{2+} responsive cells was linear, indicative of GluT astrocytes (Fig. 2C,E, $n=7$ cells in 3 slices, mean $R_x=1.04 \pm 0.11$ not significantly different from control GluT Rx, see also Fig. 1C, $p>0.5$, Student's unpaired t test). A second type of calcium response was brief and oscillating with a significantly shorter delay from NMDA onset to peak Ca^{2+} rise (2.5 ± 0.7 minutes, $p<0.05$, Student's unpaired t test). The rectifying current-voltage relation was typical of GluR astrocytes (Fig. 2F, $n=3$ cells in 3 slices, mean $R_x=3.23 \pm 0.68$ not significantly different from control GluR Rx, see also Fig. 1D, $p>0.1$, Student's unpaired t test). These results indicate that

both GluT and GluR astrocytes show Ca^{2+} activation by NMDA but with different response kinetics in the two cell types.

5.1.4.3 NMDA RECEPTOR-MEDIATED MODULATION OF HOMOTYPIC GLIAL CELL COUPLING.

Another important cell-type specific difference in astrocytes is the extent of cell coupling, being extensive in GluT but not in GluR cells. Hence, we tested whether NMDA differentially modulated the coupling in these types of astrocytes. To measure astrocytic coupling we injected biocytin into a single astrocyte during whole-cell recording and counted, after biocytin revelation, the number of labeled astrocytes.

In control conditions, after whole cell recording from a single GluT astrocyte, 7.2 ± 3.5 biocytin filled cells were labeled (n=9 slices, Figs. 3A,B). In contrast, when a single GluR astrocyte was recorded and injected, biocytin virtually never diffused to surrounding cells (n=9 slices, Figs. 3A,C). The regulation of the astrocytic syncytium by NMDA was tested by perfusing the agonist during whole cell recording and labeling of a single astrocyte. Interestingly, the extent of the syncytium labeled after injection of a single GluT cell was significantly increased following a 2 minute application of NMDA (25 μM) (69.1 ± 19.3 labeled cells; n=9 slices, $p < 0.05$, one-way ANOVA/Newman Keuls test, Figs. 3A,B). NMDA had no effect on the coupling of GluR cells (n=9 slices, Figs. 3A,C). Hence, NMDA application differentially increased coupling in GluT but not GluR astrocytes.

We examined the effects of NMDA in the presence of TTX to test if the increase in GluT coupling required action potential-dependent synaptic activity. TTX (1 μ M) was applied for 15 minutes prior to obtaining whole cell recording from astrocytes and throughout the complete experiment. After recording from a single GluT astrocyte in TTX, the number of biocytin labeled cells after NMDA application was significantly smaller (average of 24.0 ± 13.8 astrocytes, $n=9$ slices) than in the absence of TTX and was not significantly different from the control values ($p>0.05$, one-way ANOVA/Newman Keuls test, Figs. 3A,B). In the presence of TTX, coupling of GluR astrocytes was still not observed ($n=1$ slice, Fig. 3C). These results suggest that the NMDA-induced increase in GluT astrocyte coupling is indirect and involve action potential-dependent synaptic activity of neuronal elements.

5.1.4.4 EFFECTS OF NMDA ON MEMBRANE PROPERTIES.

Changes in input resistance have been shown to occur when cell coupling is modified (Blomstrand et al., 2004). We thus tested if NMDA application modulates cell input resistance. Although reported values are not always consistent, GluT astrocytes generally have a lower input resistance than GluR cells (D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). Input resistance was measured in current clamp mode by applying hyperpolarizing current pulses (100 pA, 100 ms, 2 sec^{-1}) at resting membrane potential. In control conditions, GluT cells had a significantly lower

resting input resistance ($18.3 \pm 3.0 \text{ M}\Omega$) than GluR cells ($34.9 \pm 5.6 \text{ M}\Omega$; $n=25$ cells each, $p<0.001$, unpaired Student's t test, Fig. 4C). Stable recordings of input resistance were obtained from both GluT and GluR cells and could be maintained for long periods of time (up to 1 hour) with less than 3% variation from baseline. NMDA application significantly reduced input resistance of GluT and GluR cells. In GluT astrocytes, NMDA caused a $63.6 \pm 5.7 \%$ reduction in input resistance (Fig. 4A, $n=25$ cells, $p<0.01$, paired Student's t test). In GluR cells, NMDA caused a $25.7 \pm 4.5 \%$ reduction in input resistance (Fig. 4B, $n=25$ cells, $p<0.05$, paired Student's t test). The NMDA-induced reduction in input resistance was significantly smaller in GluR than GluT astrocytes ($n=25$ cells each, $p<0.001$, unpaired Student's t test, Fig. 4D). The NMDA-induced changes in input resistance were transient and always returned to baseline values (Fig. 4). These results suggest that NMDA activation increases conductances of GluT and GluR astrocytes. Hence, we next tested whether NMDA affected membrane potential of these astrocytes.

Although also not always consistent, resting membrane potential values of GluT astrocytes are generally more hyperpolarized than those of GluR cells (Blomstrand et al., 2004; Bordey and Sontheimer, 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). Resting membrane potential was recorded in whole-cell current clamp mode from both astrocyte subtypes. In our conditions, and consistent with previous reports (D'Ambrosio et al., 1998; McKhann et al., 1997), GluT astrocytes showed a

resting membrane potential of -79.6 ± 0.7 mV with values spanning a wide range (from -87.7 to -70.1 mV) and a bimodal distribution (Fig. 5A). GluR astrocytes displayed a resting membrane potential of -75.8 ± 1.0 mV, also with bimodally distributed values (Fig. 5B) and wide range (between -86.2 and -64.8 mV). The resting membrane potential was significantly more depolarized in GluR than GluT cells ($n=50$ cells each, $p<0.005$, unpaired Student's *t* test, Figs. 5C,F). In control conditions, stable membrane potential could be recorded for long periods of time (variations less than 2 mV). NMDA application depolarized the membrane of both types of astrocytes (Figs. 5D,E). The peak amplitude of depolarization was 21.3 ± 1.1 mV in GluT cells ($n=25$ cells) and 23.4 ± 2.0 mV in GluR astrocytes ($n=25$ cells). These values were not significantly different ($p>0.2$, unpaired Student's *t* test, Fig. 5F). As a whole, these results indicate that NMDA activates astrocytes through different modalities (Ca^{2+} rises, increase in cell coupling, change in input resistance and membrane depolarization).

5.1.4.5 NMDA-INDUCED ACTIVATION OF GLUT AND GLUR CELLS INVOLVE DIFFERENT MECHANISMS.

The presence of glutamate transporters and their associated currents found only in GluT astrocytes, is a fundamental difference distinguishing GluT and GluR cells (Matthias et al., 2003). To test if a glutamate transporter current differentially contribute to NMDA-induced depolarization in these cells, we applied NMDA in the presence of dihydrokainate (DHK), a glutamate transporter blocker. NMDA induced depolarizations could be repeated in a

given cell without significant changes in amplitude or kinetics, indicating that multiple NMDA applications could be used to test blockers in single experiments (data not shown). Hence, NMDA-induced depolarizations were recorded in the same astrocytes in control conditions and in the presence of DHK. In GluT astrocytes, the amplitude of the NMDA-induced depolarization was significantly reduced by 17.8 ± 2.9 % in the presence of DHK (300 μ M) (Student's paired *t* test, $p < 0.05$, $n = 3$, Fig. 6A-C). In GluR astrocytes, the amplitude of the depolarization was not significantly changed in DHK (0.3 ± 21.8 %; Student's paired *t* test, $p > 0.5$, $n = 5$, Fig. 6D-F). These results indicate that glutamate transporters contribute in part to NMDA-induced depolarization in GluT, but not GluR, cells.

The reduction by TTX of the NMDA-induced increase in syncytium connectivity suggests that an indirect pathway contribute to NMDA activation of astrocytes. This is not unexpected since NMDA bath applications may activate many different components of the hippocampal network. To test if this is also the case for NMDA-induced depolarization, we next examined if astrocyte depolarization was affected when action potential-dependent neurotransmitter release was blocked by TTX. In GluT astrocytes, the amplitude of NMDA-induced depolarizations was significantly reduced by 43.0 ± 7.9 % in the presence of TTX (1 μ M) (Student's paired *t* test, $p < 0.005$, $n = 5$, Fig. 7A-C). In contrast, in GluR astrocytes, the amplitude of depolarizations was not significantly changed in the presence of TTX ($6.8 \pm$

4.1 %; Student's paired *t* test, $p > 0.05$, $n = 5$, Fig. 7D-F). These results suggest that NMDA-induced depolarizations are in part indirect in GluT, but not GluR, cells and involve action potential-dependent activation of neuronal NMDA receptors.

5.1.4.6 NMDA-INDUCED RESPONSES IN GLUT ASTROCYTES REQUIRE AN INDIRECT GABAERGIC CONTRIBUTION.

We next tested if the indirect activation of GluT astrocytes involved GABA receptors since they have been shown to be involved in astrocyte activation (Fraser et al., 1995; Kang et al., 1998; Kettenmann et al., 1984; Serrano et al., 2006; Zhou and Kimelberg, 2001) and that GABA is released in the hippocampus during NMDA bath application (Saransaari and Oja, 1997).

We first tested the involvement of GABA_A receptors since they are known to induce astrocytic depolarization (Fraser et al., 1995; Kettenmann et al., 1984; Zhou and Kimelberg, 2001). We recorded NMDA-induced depolarization in the same GluT astrocytes in control conditions and during application of the GABA_A receptor antagonist, bicuculline. The amplitude of NMDA-induced depolarizations was not significantly changed in the presence of bicuculline (10.9 ± 6.9 %; Student's paired *t* test, $p > 0.1$, $n = 5$, Fig. 8A-C). These data suggest that GABA_A receptors are not involved in NMDA-induced depolarizations of GluT astrocytes.

We next tested the role of GABA_B receptors since these receptors mediate Ca²⁺ increases in astrocytes (Kang et al., 1998; Serrano et al., 2006). We recorded in the same GluT cells, NMDA-induced depolarizations in control conditions and in the presence of the GABA_B receptor antagonist CGP55845. CGP55845 significantly reduced NMDA-induced depolarization amplitude by 48.1 ± 3.9 % (Student's paired *t* test, $p < 0.005$, $n = 5$, Fig. 8D-F). These results suggest that GABA_B receptors partially mediate NMDA-induced depolarizations and likely contribute to the indirect, TTX-dependent component of the response in GluT cells.

Since our results suggest that GABA_B receptors are involved in GluT astrocyte depolarization and GABA_B receptors have been shown to mediate Ca²⁺ increases in astrocytes (Kang et al., 1998; Serrano et al., 2006), we tested if preventing Ca²⁺ rises in astrocytes affected depolarizations. Intracellular Ca²⁺ level was buffered with a high concentration of BAPTA in the patch pipette, a procedure known to block Ca²⁺ increases in astrocytes (Serrano et al., 2006). Basic properties of astrocytes were maintained in the presence of 36 mM intracellular BAPTA (data not shown). Resting membrane potential was unaffected by the Ca²⁺ buffer in both GluT cells (control cells -80.1 ± 2.0 mV, cells with BAPTA -80.5 ± 2.5 mV, Student's unpaired *t* test, $p > 0.5$, $n = 5$ cells) and GluR cells (control cells -82.8 ± 2.8 mV, cells with BAPTA -85.1 ± 0.7 mV, Student's unpaired *t* test, $p > 0.4$, $n = 5$ cells).

When tested on GluT astrocytes with intracellular BAPTA, NMDA applications induced a depolarization (25.4 ± 3.4 mV) similar to that in control cells (without BAPTA) (Student's unpaired *t* test, $p > 0.1$, $n = 5$, Fig. 9A-C). These data indicate that NMDA-induced depolarizations are not dependent on intracellular Ca^{2+} rises in GluT astrocytes.

We next investigated if Ca^{2+} entry could be involved in NMDA-induced depolarization of GluT astrocytes by lowering extracellular Ca^{2+} concentration. Experiments were performed on the same astrocytes in control conditions and during perfusion of low extracellular Ca^{2+} concentration (0.5 mM). Lowering extracellular calcium significantly reduced NMDA-induced depolarization of GluT cells by 34.8 ± 6.3 % (Student's paired *t* test, $p < 0.001$, $n = 5$, Fig. 9D-F). These results suggest that Ca^{2+} entry is partly involved in NMDA-induced depolarization of GluT astrocytes.

Overall, these results described so far suggest that NMDA-induced depolarization of GluT astrocytes is in part mediated by an indirect pathway involving GABA_B but not GABA_A receptors, and does not require an intracellular Ca^{2+} rise but involves, in part, Ca^{2+} entry. We next tested if similar mechanisms were involved in the activation of GluR astrocytes.

5.1.4.7 NMDA-INDUCED RESPONSES IN GLUR ASTROCYTES DO NOT INVOLVE A GABAERGIC PATHWAY.

Based on the lack of effect of TTX on NMDA-induced depolarization one would predict that NMDA activation would not be affected by GABAergic receptor antagonists. Not unexpectedly, NMDA-induced depolarizations in GluR astrocytes were not significantly modified in the presence of bicuculline (1.9 ± 3.5 % change, Student's paired *t* test, $p > 0.1$, $n = 5$, Fig. 10A-C). Additionally, CGP55845 had no significant effect on the amplitude of NMDA-induced depolarizations (2.8 ± 10.6 %, Student's paired *t* test, $p > 0.1$, $n = 5$, Fig. 10D-F). These results indicate that neither GABA_A nor GABA_B receptors are involved in NMDA-induced depolarizations of GluR astrocytes.

We next tested if Ca²⁺ rises or Ca²⁺ entry were necessary for NMDA-induced depolarization of GluR astrocytes. In the presence of BAPTA, NMDA-induced GluR depolarizations were not significantly different (33.2 ± 6.1 mV, Student's unpaired *t* test, $p > 0.1$, $n = 5$, Fig. 10A-C) from control values in GluR cells recorded without BAPTA. In contrast, lowering extracellular calcium concentration significantly reduced NMDA-induced depolarizations in GluR cells by 81.8 ± 3.1 % (Student's paired *t* test, $p < 0.005$, $n = 5$, Fig. 10D-F). These data suggest that NMDA-induced depolarization of GluR astrocytes is dependent on Ca²⁺ entry but not on an intracellular Ca²⁺ rise.

Overall, the results of this last series of experiments suggest that NMDA-induced depolarization in GluR astrocytes does not involve an indirect GABAergic pathway as in GluT astrocytes. Moreover, GluR astrocyte depolarization by NMDA may be mostly mediated by direct Ca^{2+} entry and not dependent on an intracellular Ca^{2+} rise.

5.1.5 DISCUSSION

The NMDA receptor is an important glutamate ionotropic receptor in the central nervous system. Here we establish that the NMDA receptor is not only involved in neuronal synaptic transmission but that it is also a key element in astrocytic activation in a cell-type specific manner. Our data suggests that, in GluT cells, NMDA-induced depolarization is not dependent on an astrocytic Ca^{2+} rise, partially involves Ca^{2+} entry and engages both a polysynaptic indirect pathway activating glutamate transporters, GABA_B , but not GABA_A , receptors, and a direct effect of NMDA. Also, TTX-dependent, indirect NMDA activation of GluT astrocytes regulates the level of gap junction coupling between these cells. In contrast, our data indicate that, in GluR cells, NMDA-induced depolarization does not require a Ca^{2+} rise in the astrocyte but is mediated directly by Ca^{2+} entry independent of glutamate transporters, GABA_B and GABA_A receptors. Our findings reveal that NMDA activates hippocampal astrocytes and the glial network through heterogeneous mechanisms that are cell-type specific.

5.1.5.1 IDENTIFICATION OF GLUT AND GLUR CELLS THROUGH DISTINCT PROPERTIES

The use of GFAP-GFP transgenic mice allowed us to unequivocally identify astrocytes and specifically record from them. Different types of glial cells were identified based on established criteria from other laboratories (Bordey and Sontheimer, 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al., 2003; Steinhauser et al., 1992; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). Two main populations of astrocytes, GluT and GluR cells, were identified based on the intensity of the intrinsic GFP fluorescence, their whole cell membrane current-voltage relation, overall morphology and the presence of cell coupling. The first type correspond to linear astrocytes or GluT cells identified in comparable studies on hippocampal astrocytes *in situ* or freshly isolated astrocytes (Bordey and Sontheimer, 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al., 2003; Steinhauser et al., 1992; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). These cells have low input resistance, hyperpolarized resting membrane potential, linear whole cell current-voltage relationship, prominent GFP-positive processes and always show coupling. The second cell type correspond to the previously described outwardly rectifying astrocytes or GluR cells (Bordey and Sontheimer, 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al., 2003; Steinhauser et al., 1992; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). These cells show a higher input resistance, outwardly rectifying whole cell current-voltage relationship, fainter GFP-labeling of processes and no coupling. Other intermediary, complex, variably rectifying glia or immature population of astrocytes (Bordey and Sontheimer, 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al.,

2003; Steinhauser et al., 1992; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006) were rarely encountered in our experiments and were not considered in this study. This is consistent with the observation that GluT and GluR cells represent the majority of hippocampal astrocytes in young mice (Zhou et al., 2006). No attempt was made to record from GFAP negative astrocytes that could be present in the hippocampus (Walz, 2000a). Given our findings of cell-type specific mechanisms of action of NMDA in GluT and GluR astrocytes, it will be important to examine NMDA-related mechanisms in these other specific glial cell types as well.

5.1.5.2 FUNCTIONAL NMDA RECEPTORS ON ASTROCYTES

It was previously shown that Ca^{2+} rises were elicited in hippocampal astrocytes by NMDA application but no attempt was made to differentiate cell types involved (Latour et al., 2001; Porter and McCarthy, 1995; Serrano et al., 2006). Here we show that NMDA responses were evoked in both GluT and GluR astrocytes. We found that not only both GluT and GluR cells in rat hippocampus appear to bear functional NMDA receptors but they also differ in terms of their NMDA-dependent mechanisms of activation. We observed that NMDA-induced depolarization of GluT cells, but not GluR cells, is partly indirect and requires GABA_B receptors, further suggesting a difference in GABA_B receptor function in these astrocyte subtypes. NMDA-induced astrocytic activation appears also partly direct since a component of GluT cell depolarization, as well as the complete GluR cell depolarization, are TTX-insensitive. This direct activation of astrocytes by NMDA is consistent with the reported presence of functional NMDA receptors on

astrocytes. Interestingly, there is evidence that functional NMDA receptors are present on cortical astrocytes (Conti et al., 1996; Lalo et al., 2006; Schipke et al., 2001) while Porter and McCarthy (1995) reported that NMDA-induced activation of astrocytes was either TTX-sensitive or insensitive. Although remote, we cannot rule out the alternative that TTX-independent activation of astrocytes by NMDA might be secondary to presynaptic activation of NMDA receptors causing TTX-insensitive transmitter release (Nicholls and Attwell, 1990; Smirnova et al., 1993a; Smirnova et al., 1993b; Tzingounis and Nicoll, 2004) and subsequent activation of astrocytes.

5.1.5.3 HETEROGENEOUS GLUTAMATERGIC REGULATION IN ASTROCYTES

The differential activation of the two subpopulations of astrocytes by NMDA is part of complex glutamatergic regulatory mechanisms that are specific for each cell type. For instance, functional AMPA receptors are present on GluR astrocytes (Matthias et al., 2003; Seifert and Steinhauser, 1995; Steinhauser et al., 1994; Zhou and Kimelberg, 2001) while GluT astrocytes lack these receptors but are enriched with glutamate transporters that can produce large depolarizing transporter currents (Matthias et al., 2003; Zhou and Kimelberg, 2001). This difference in glutamatergic mechanisms strongly suggests that distinct functions are carried by GluT and GluR cells in hippocampal networks.

The differential activation of GluT and GluR astrocytes by NMDA reveals another level of glutamatergic regulation in these cells. This suggests that, in addition to

glutamate transporters, NMDA receptors could enable both GluT and GluR astrocytes to sense synaptically released glutamate. Moreover, NMDA only increases coupling of GluT astrocytes suggesting that, in these cells, NMDA receptors are involved in long range glial signaling whereas in GluR astrocytes they would play a role in local glial activity. The activation of GluT cells also appears to involve inhibitory interneurons since GABA and GABA_B receptors are in part required for the NMDA-induced activation of GluT astrocytes. This involvement of GABAergic interneurons could result in a further widespread NMDA-induced activation of GluT cells. In contrast, GluR astrocytes could be activated more locally via either AMPA or NMDA receptors. These multiple glutamatergic mechanisms of astrocyte activation provide a range of mechanisms for cell-type specific astrocyte interaction at synapses. It will be interesting to determine if NMDA and AMPA receptors are clustered in different microdomains of astrocytes, and activated by different inputs, or if both receptors are present at the same sites but activated by different synaptic conditions.

5.1.5.4 GABAERGIC CONTRIBUTION

We observed that GluT astrocyte depolarization induced by NMDA involves an indirect neuronal contribution mediated by GABA_B receptors. This GABA_B receptor contribution is consistent with previously reported GABA_B receptor mediated astrocytic Ca²⁺ responses evoked by Schaffer collateral stimulation or NMDA application (Serrano et al., 2006). Also, direct activation of GABA_B receptors has been shown to induce Ca²⁺ rises in astrocytes, dependent on

extracellular calcium (Kang et al., 1998; Nilsson et al., 1993). Therefore, GABA_B receptors in astrocytes are linked to Ca²⁺ homeostasis and membrane depolarization. GABA_A-mediated depolarizations also occur in astrocytes, in particular in neuron-free conditions (MacVicar et al., 1989), in cultured cells (Kettenmann and Schachner, 1985), in acutely isolated astrocytes (Fraser et al., 1995) or in astrocytes in intact hippocampal slices (Steinhauser et al., 1994). In those conditions, GABA_A mediated depolarizations seem to be mainly mediated by Cl⁻ channel opening (MacVicar et al., 1989). Our findings clearly indicate that, in our conditions, such GABA_A receptor mechanisms are not involved in NMDA-induced responses in GluT or GluR astrocytes.

5.1.5.5 MEMBRANE DEPOLARIZATION

We observed that NMDA induced large depolarizations (20 mV in amplitude) in both GluT and GluR astrocytes. In cultured astrocytes, membrane depolarization induced by glutamate or GABA has been shown to reach more than 25 mV (Kettenmann et al., 1984; Kettenmann and Schachner, 1985). However, in the optic nerve or in kainic acid-lesioned hippocampus, it is reported that small depolarization (1 to 10 mV in amplitude) can be induced by high concentration of GABA (Butt and Jennings, 1994; MacVicar et al., 1989). To our knowledge, our results are the first to show that astrocytes *in situ*, and more specifically GluT and GluR cells, show large direct and indirect NMDA-induced depolarizing responses.

Such large depolarization of astrocytes may have numerous consequences. First, by modifying ionic gradients, depolarizations can affect glutamate transporter function. Such changes in glutamate transporter would be more functionally important in GluT than GluR cells. Second, large depolarizations could also modify astrocytic buffering of extracellular K^+ (Newman et al., 1984; Wallraff et al., 2006; Walz, 2000b). Third, large membrane depolarizations may reach the threshold of voltage gated calcium channels, as in Müller cells (Newman, 1985) and hippocampal astrocytes (Akopian et al., 1996), and cause Ca^{2+} entry (Duffy and MacVicar, 1994). Such increases in cytosolic calcium may influence signaling pathways involved in gliotransmitter release (Araque et al., 2000; Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b; Bezzi et al., 1998; Innocenti et al., 2000; Kang et al., 1998; Parpura and Haydon, 2000; Sanzgiri et al., 1999), intercellular astrocytic communication involving gap junctions (Cotrina et al., 1998; Giaume and McCarthy, 1996; Giaume and Venance, 1998), or some forms of synaptic plasticity mediated by astrocytic Ca^{2+} mechanisms (Araque et al., 1999; Serrano et al., 2006; Zhang et al., 2003).

In previous work, we found that Ca^{2+} activation of hippocampal astrocytes is necessary for NMDA receptor-mediated heterosynaptic depression (Serrano et al., 2006). Since NMDA receptor activation causes depolarization of astrocytes, the depolarization could also be required for heterosynaptic depression. This is unlikely since BAPTA injection in astrocytes blocked heterosynaptic depression while it did not affect NMDA-induced depolarization in astrocytes. Alternatively,

it is possible that NMDA-induced depolarization of astrocytes is either upstream of the calcium rise or independent of it. In either case, Ca^{2+} entry contributes differently to GluT and GluR cell depolarization since in the absence of extracellular Ca^{2+} , NMDA-induced depolarization was partly reduced in GluT astrocytes and virtually completely blocked in GluR astrocytes.

5.1.5.6 MODULATION OF CELL COUPLING AND MEMBRANE RESISTANCE BY NMDA.

NMDA application enhanced GluT astrocytic intercellular coupling leading to the formation of an extensive syncytium. Importantly, this increase in coupling was abolished in the presence of TTX suggesting that this regulation is indirectly mediated by NMDA-induced neuronal activity. This is in agreement with the findings of Rouach et al. (2004) that neuronal activity controls the extent of astrocytic coupling. As a whole, these data suggest that the NMDA-induced indirect neuronal contribution (probably through GABA release) is more important to cell coupling than the NMDA-induced direct depolarization, which persisted in the presence of TTX. Moreover, the NMDA-induced direct depolarization is not involved in astrocyte coupling since changes in membrane resistance and depolarization occurred in presence of TTX while cell coupling was blocked.

Astrocytic gap-junction coupling is particularly relevant to glial communication and synaptic physiology (Cotrina et al., 1998; Rouach et al., 2002). For instance, astrocyte coupling is required for buffering of extracellular K^+ (Wallraff et al., 2006) or release of glutamate (Anderson and Swanson, 2000) during neuronal

activity. Interestingly, astrocyte coupling and input resistance are controlled by neuronal activity (Blomstrand et al., 2004; Rouach et al., 2004). Gap-junction coupling is also important in astrocyte mediated synaptic plasticity, such as in heterosynaptic depression (Serrano et al., 2006). The syncytial coupling of GluT astrocytes is compatible with a role in synaptic plasticity involving longer range of action. Although GluR astrocytes show input resistance reduction in response to NMDA, their lack of coupling in a large syncytium suggests a lack of involvement in these long range functions. It is important to note that astrocytes can also induce synaptic plasticity locally, independent of extensive coupling (Araque et al., 1998b; Zhang et al., 2003), and such local functions could involve both GluT and GluR astrocytes.

In conclusion, we found that NMDA receptor-induced effects in astrocytes involve multiple cell-type specific mechanisms suggesting that NMDA receptors are important for both neuronal and astrocyte activation.

5.1.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aude Panatier for stimulating discussions on the manuscript and Julie Pepin for technical assistance with biocytin revelation. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to RR and JCL. A.S. was supported by a fellowship from the Groupe de Recherche sur le système nerveux central (GRSNC) of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.-C.L. is the recipient of a Canada Research Chair in Cellular

and Molecular Neurophysiology. R.R. is the recipient of a Chercheur National award from FRSQ.

5.1.7 REFERENCES

- Akopian G, Kressin K, Derouiche A, Steinhauser C. 1996. Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca²⁺ currents. *Glia* 17(3):181-94.
- Anderson CM, Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32(1):1-14.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. 2004. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24(31):6920-7.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG. 2000. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20(2):666-73.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1998a. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10(6):2129-42.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22(5):208-15.
- 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(17):6822-9.

- Auld DS, Robitaille R. 2003. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40(2):389-400.
- Bergles DE, Jahr CE. 1997. Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19(6):1297-308.
- Bergles DE, Jahr CE. 1998. Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18(19):7709-16.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzi BL, Pozzan T, Volterra A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391(6664):281-5.
- Blomstrand F, Venance L, Siren AL, Ezan P, Hanse E, Glowinski J, Ehrenreich H, Giaume C. 2004. Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 19(4):1005-15.
- Bordey A, Sontheimer H. 1997. Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J Neurophysiol* 78(1):461-77.
- Bordey A, Sontheimer H. 1998. Passive glial cells, fact or artifact? *J Membr Biol* 166(3):213-22.
- Butt AM, Jennings J. 1994. Response of astrocytes to gamma-aminobutyric acid in the neonatal rat optic nerve. *Neurosci Lett* 168(1-2):53-6.
- 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(3):254-8.

- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M. 1998. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15735-40.
- D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, McKhann GM, 2nd, Janigro D. 1998. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 18(12):4425-38.
- Duffy S, MacVicar BA. 1994. Potassium-dependent calcium influx in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Neuroscience* 61(1):51-61.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43(5):729-43.
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA. 1995. GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15(4):2720-32.
- Giaume C, McCarthy KD. 1996. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19(8):319-25.
- Giaume C, Venance L. 1998. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24(1):50-64.
- Huang YH, Bergles DE. 2004. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14(3):346-52.
- Innocenti B, Parpura V, Haydon PG. 2000. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci* 20(5):1800-8.

- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1(8):683-92.
- Kettenmann H, Backus KH, Schachner M. 1984. Aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 52(1-2):25-9.
- Kettenmann H, Schachner M. 1985. Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci* 5(12):3295-301.
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A. 2006. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 26(10):2673-83.
- Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC. 2001. Differential mechanisms of Ca²⁺ responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* 11(2):132-45.
- Li R, Dozmorov M, Hellberg F, Tian Y, Jilderos B, Wigstrom H. 2004. Characterization of NMDA induced depression in rat hippocampus: involvement of AMPA and NMDA receptors. *Neurosci Lett* 357(2):87-90.
- MacVicar BA, Tse FW, Crichton SA, Kettenmann H. 1989. GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices. *J Neurosci* 9(10):3577-83.
- Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA. 1994. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265(5181):2098-101.

- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhauser C. 2003. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 23(5):1750-8.
- McKhann GM, 2nd, 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(18):6850-63.
- Newman EA. 1985. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* 317(6040):809-11.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL. 1984. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225(4667):1174-5.
- Nicholls D, Attwell D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11(11):462-8.
- Nilsson M, Eriksson PS, Ronnback L, Hansson E. 1993. GABA induces Ca²⁺ transients in astrocytes. *Neuroscience* 54(3):605-14.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA. 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292(5518):923-6.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125(4):775-84.

- Parpura V, Haydon PG. 2000. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15):8629-34.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V. 2001. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4(8):803-12.
- 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(20):7817-30.
- Porter JT, McCarthy KD. 1995. GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in [Ca²⁺]_i. *Glia* 13(2):101-12.
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C. 2002. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94(7-8):457-75.
- Rouach N, Koulakoff A, Giaume C. 2004. Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks. *Neurochem Int* 45(2-3):265-72.
- Sanzgiri RP, Araque A, Haydon PG. 1999. Prostaglandin E₂ stimulates glutamate receptor-dependent astrocyte neuromodulation in cultured hippocampal cells. *J Neurobiol* 41(2):221-9.

- Saransaari P, Oja SS. 1997. Enhanced GABA release in cell-damaging conditions in the adult and developing mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 15(2):163-74.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9):3948-52.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F. 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *Faseb J* 15(7):1270-2.
- Seifert G, Steinhauser C. 1995. Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur J Neurosci* 7(9):1872-81.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R. 2006. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci* 26(20):5370-82.
- Smirnova T, Laroche S, Errington ML, Hicks AA, Bliss TV, Mallet J. 1993a. Transsynaptic expression of a presynaptic glutamate receptor during hippocampal long-term potentiation. *Science* 262(5132):433-6.
- Smirnova T, Stinnakre J, Mallet J. 1993b. Characterization of a presynaptic glutamate receptor. *Science* 262(5132):430-3.
- Steinhauser C, Berger T, Frotscher M, Kettenmann H. 1992. Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci* 4(6):472-484.

- Steinhauser C, Jabs R, Kettenmann H. 1994. Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 4(1):19-35.
- Tong G, Jahr CE. 1994. Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* 13(5):1195-203.
- Turecek R, Trussell LO. 2000. Control of synaptic depression by glutamate transporters. *J Neurosci* 20(5):2054-63.
- Tzingounis AV, Nicoll RA. 2004. Presynaptic NMDA receptors get into the act. *Nat Neurosci* 7(5):419-20.
- Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C. 2006. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 26(20):5438-47.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C. 2004. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48(1):36-43.
- Walz W. 2000a. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 31(2):95-103.
- Walz W. 2000b. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36(4-5):291-300.
- 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.

- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S. 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40(5):971-82.
- Zhou M, Kimelberg HK. 2001. Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J Neurosci* 21(20):7901-8.
- Zhou M, Schools GP, Kimelberg HK. 2006. Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. *J Neurophysiol* 95(1):134-43.
- Zhuo L, Sun B, Zhang CL, Fine A, Chiu SY, Messing A. 1997. Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev Biol* 187(1):36-42.

5.1.8 FIGURES AND LEGENDS

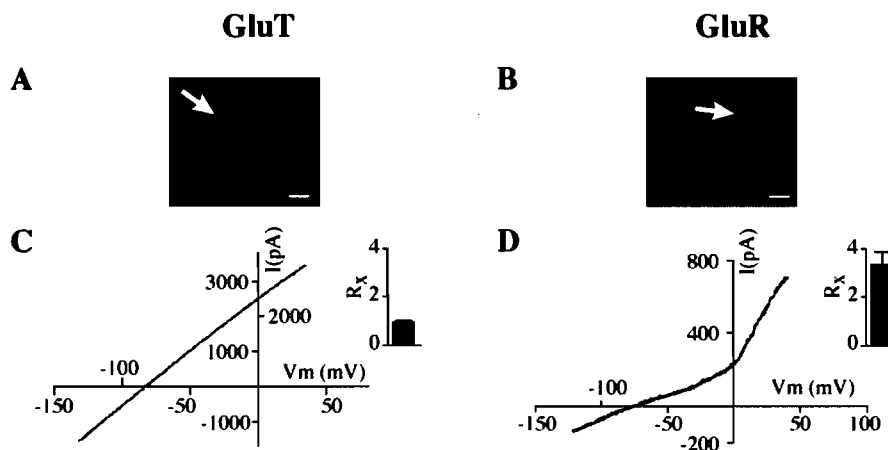


Fig. 1. Distinct types of astrocytes in the hippocampus defined by their whole-cell current-voltage relation.

(A-D) GFP-GFAP labeled GluT type of hippocampal astrocytes typically show bright fluorescence with visible processes (A) and a linear whole-cell current-voltage profile during a ramp voltage command (C). GluR astrocytes are weakly fluorescent cells (B) and have a rectifying current-voltage profile (D). Inset bar graphs in (C) and (D) show the rectification index of GluT astrocytes (n=25) and GluR astrocytes (n=25), respectively. Scale bars, 10 μ m.

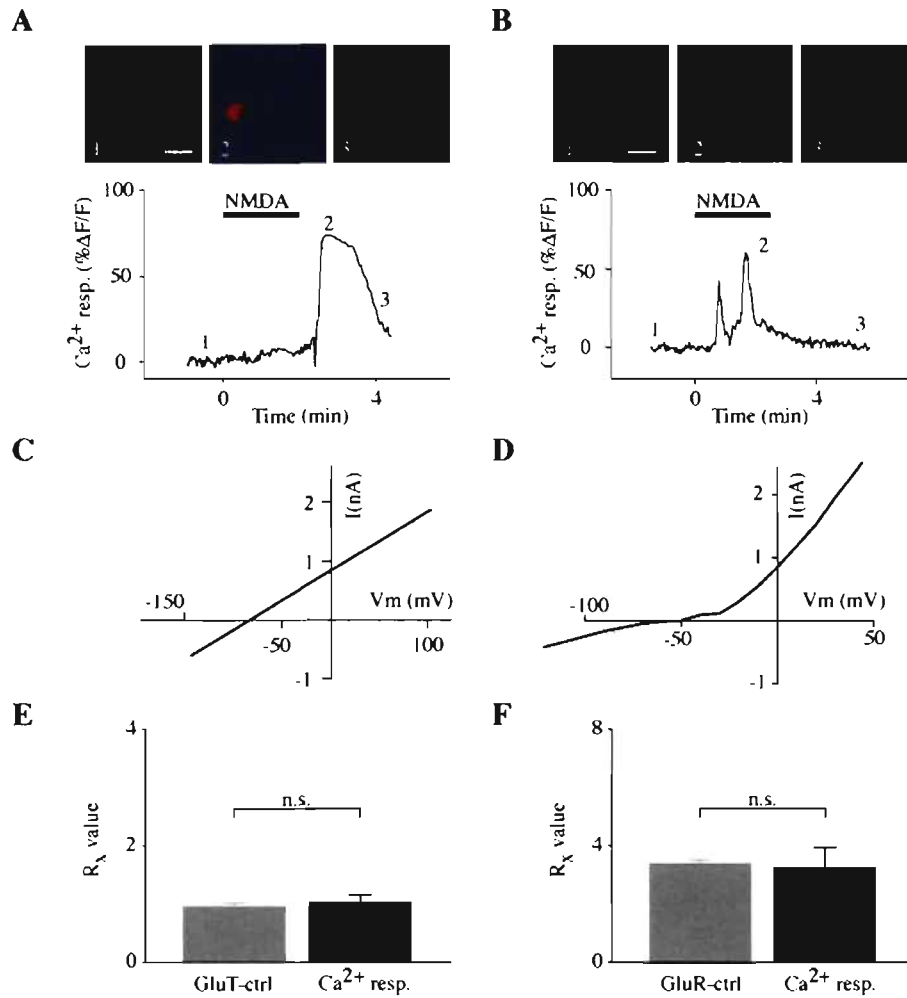


Fig. 2. GluT and GluR astrocytes show NMDA-induced Ca^{2+} rises.

(A-B) Confocal images (top) and time course of NMDA-induced Ca^{2+} rise (bottom) in single GluT (A) and GluR (B) astrocytes. (C) Linear current-voltage profile recorded from the astrocyte in (A) indicative of a GluT cell. (D) Rectifying current-voltage profile from the cell in (B) typical of a GluR cell. (E) Bar graph of rectification index values from control (same data as shown in Fig. 1) and Ca^{2+} responsive GluT astrocytes, indicating no significant difference ($p > 0.5$, Student's unpaired t test). (F) Bar graph of rectification index values from control (same data

as shown in Fig. 1) and Ca^{2+} responsive GluR astrocytes showing no significant difference ($p > 0.1$, Student's unpaired t test). Scale bars 10 μm .

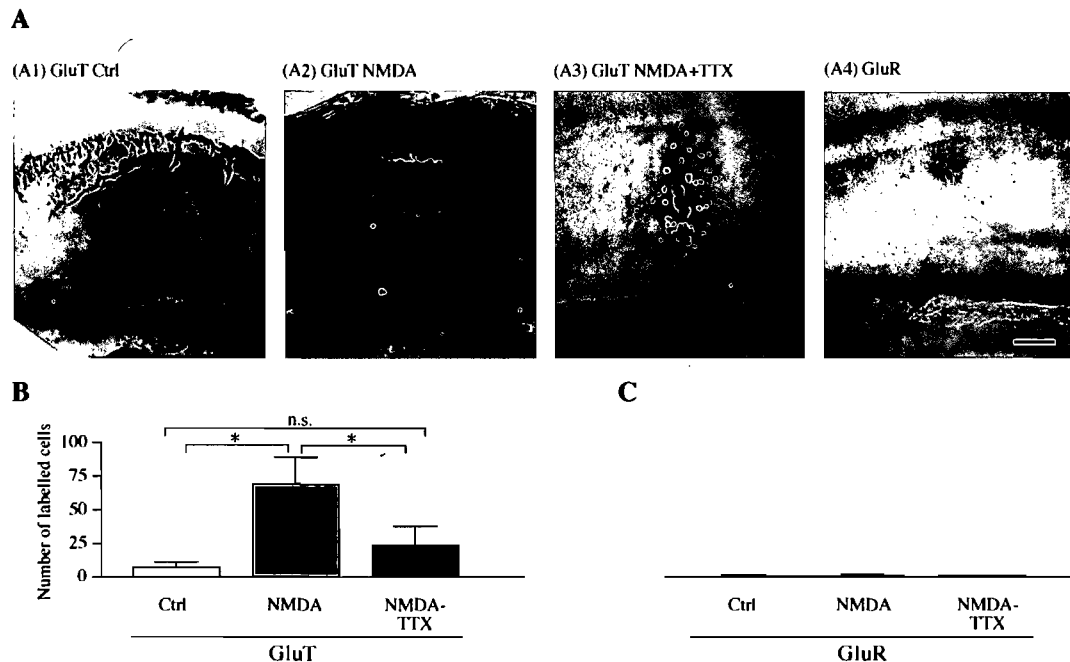


Fig. 3. NMDA induces subtype specific coupling of astrocytes.

(A) Examples of biocytin labeled astrocytes in slices after recordings from single GluT cells in control conditions without NMDA application (A1), with NMDA application (A2) and with NMDA application in the presence of TTX (A3), and from a single GluR cell in control conditions without NMDA (A4). (B) Bar graph of biocytin labeled cell-counts obtained following whole-cell recording from single GluT astrocytes in control conditions without NMDA application (n=9), with NMDA application (n=9) and with NMDA application in the presence of TTX (1 μ M, n=9), showing TTX-dependent increase in coupling of GluT cells induced by NMDA (C) Bar graph of biocytin labeled cell-counts obtained following whole-cell recording from single GluR astrocytes in control conditions (n=7), with NMDA application (n=9) and with NMDA application in the presence of TTX (1 μ M, n=3), indicating the absence of basal and NMDA-induced coupling

in GluR cells. * indicates one-way ANOVA/Newman Keuls test, $p < 0.05$. n.s. indicates Student's unpaired t test, $p > 0.1$. Scale bar 100 μm .

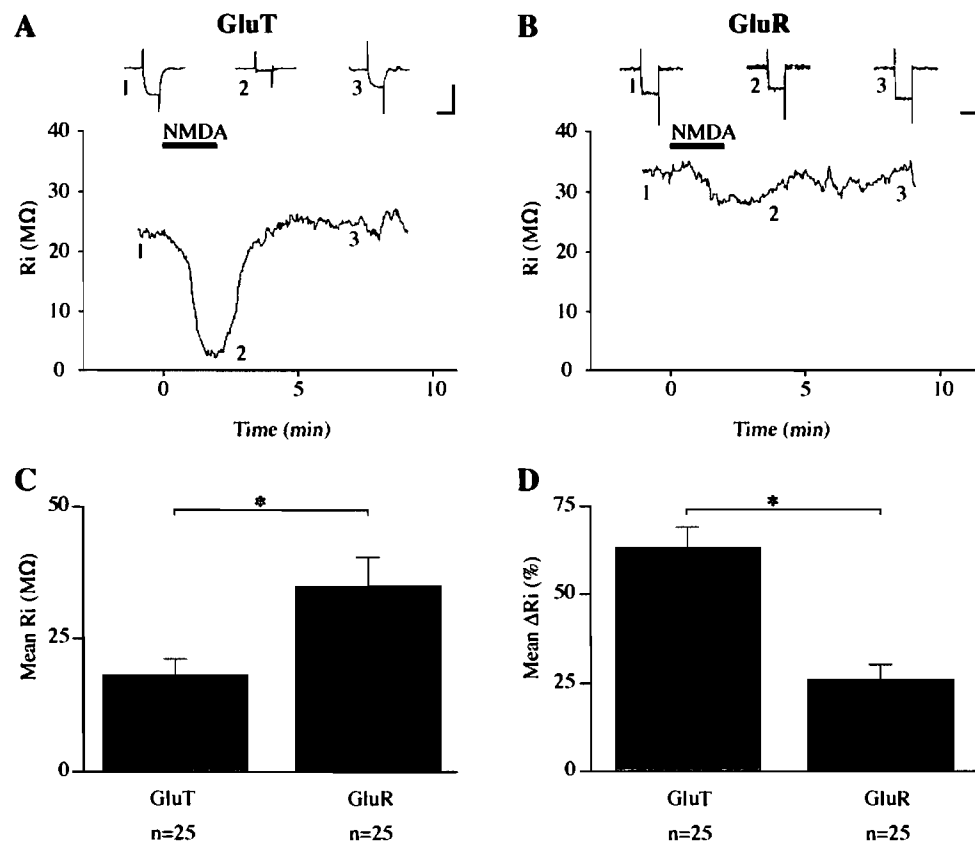


Fig. 4. NMDA reduces membrane input resistance of both GluT and GluR astrocytes.

(A-B) Membrane input resistance (R_i ; measured every 2 sec) before, during and after NMDA bath application ($25 \mu\text{M}$, 2 min.) in representative GluT (A) and GluR (B) astrocytes, showing the reduction in input resistance induced by NMDA.

Insets show membrane potential changes induced by 100 pA current steps to monitor membrane resistance at indicated times (1, 2, 3) (scale bars 5mV/20ms).

(C) Bar graph showing that resting input resistance was significantly higher in GluR than GluT cells ($p < 0.001$, Student's unpaired t test, $n = 25$ cells each).

(D) Bar graph illustrating that input resistance changes induced by NMDA was

significantly lower in GluR than GluT cells ($p < 0.001$, Student's unpaired t test, $n = 25$ cells each).

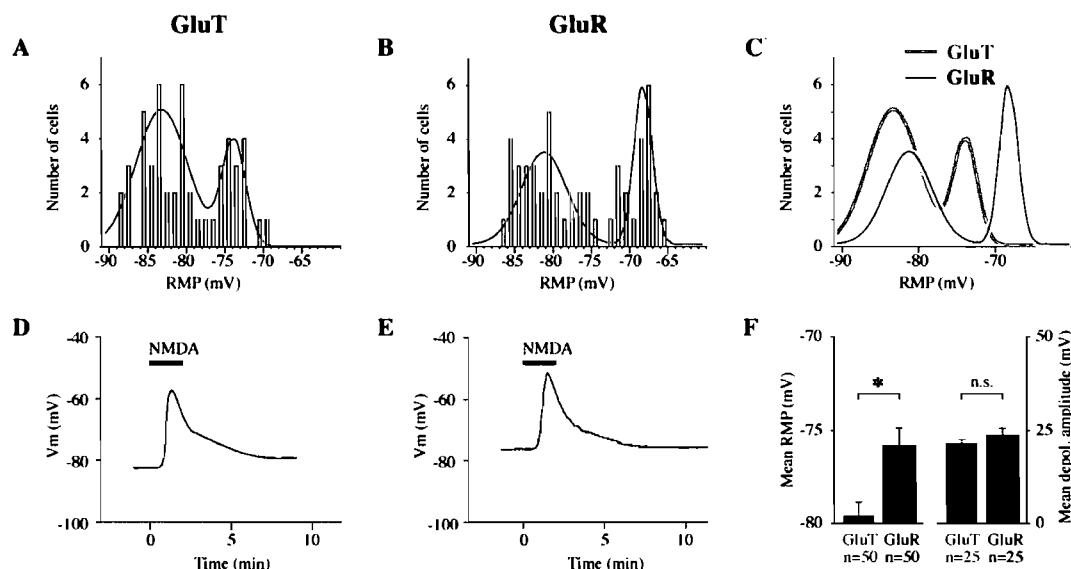


Fig. 5. NMDA depolarizes both astrocyte subtypes.

(A-B) Frequency histograms showing the distribution of resting membrane potential in GluT (A) and GluR (B) astrocytes. Superimposed is a multipeak Gaussian fit revealing the bimodal distribution of resting membrane potentials. (C) Graph of superimposed Gaussian fits from (A) and (B) showing the differential distribution of resting membrane potential values between GluT and GluR astrocytes. (D-E) Membrane potential changes induced by NMDA (25 μ M, bar) in representative single GluT (D) and GluR (E) astrocytes. (F) Bar graph showing the significantly different resting membrane potential (left) between GluT and GluR cells ($p < 0.05$, Student's unpaired t test) and the similar amplitude of NMDA-induced depolarizations (right) in GluT and GluR astrocytes ($p > 0.2$, Student's unpaired t test).

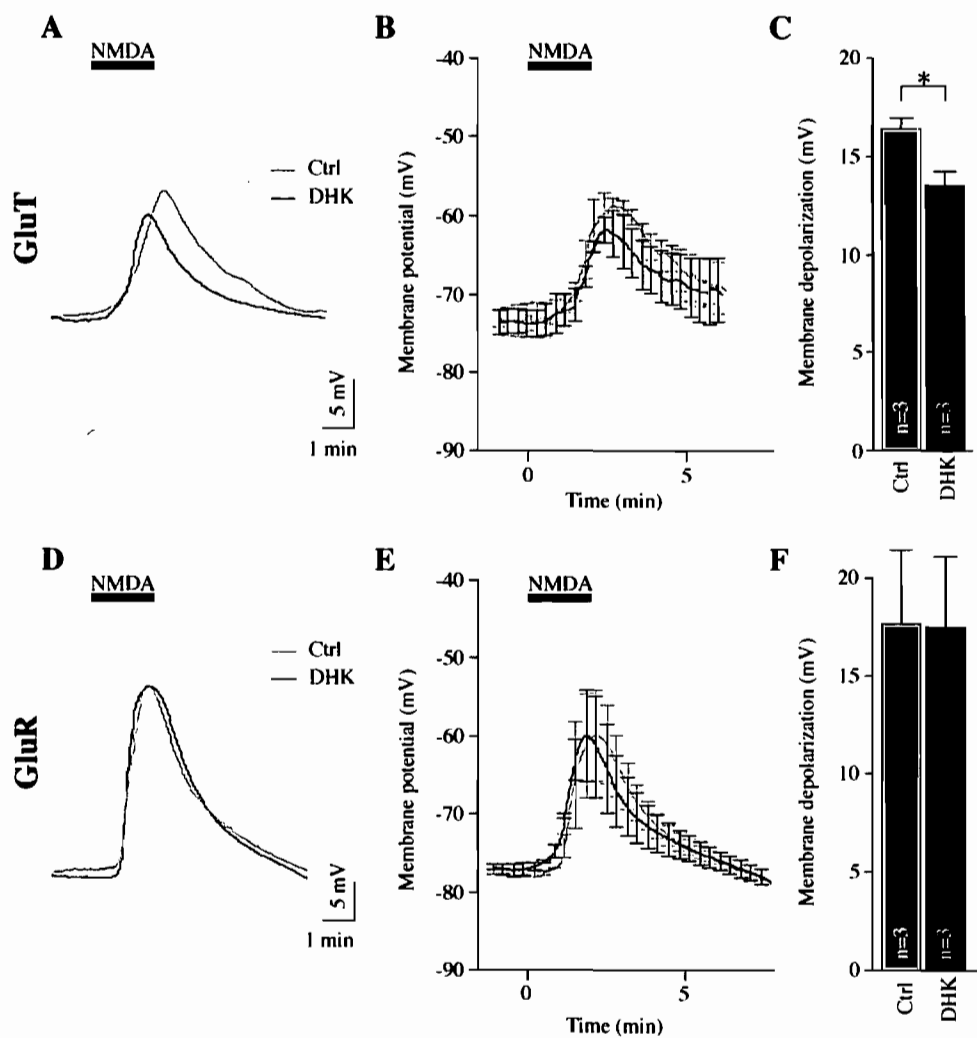


Fig. 6. Glutamate transporters are involved in GluT but not in GluR astrocyte depolarization.

(A) Membrane potential change induced by NMDA (25 μ M, bar) in a single GluT astrocyte in control (grey) and in the presence of DHK (300 μ M, black). (B) Mean depolarizations \pm S.E.M. for 3 GluT cells in control (grey) and in DHK (black). (C) Bar graph showing the reduction in membrane depolarization induced by NMDA in GluT astrocytes in the presence of DHK (Student's paired *t* test, $p < 0.05$). (D-E) Example from a single GluR cell (D) and mean traces \pm S.E.M.

from 3 GluR cells (**E**) in control (grey) and in the presence of DHK (300 μ M, black). (**F**) Bar graph showing the similar NMDA-induced membrane depolarization in GluR cells in control and in DHK. * indicate $p < 0.05$.

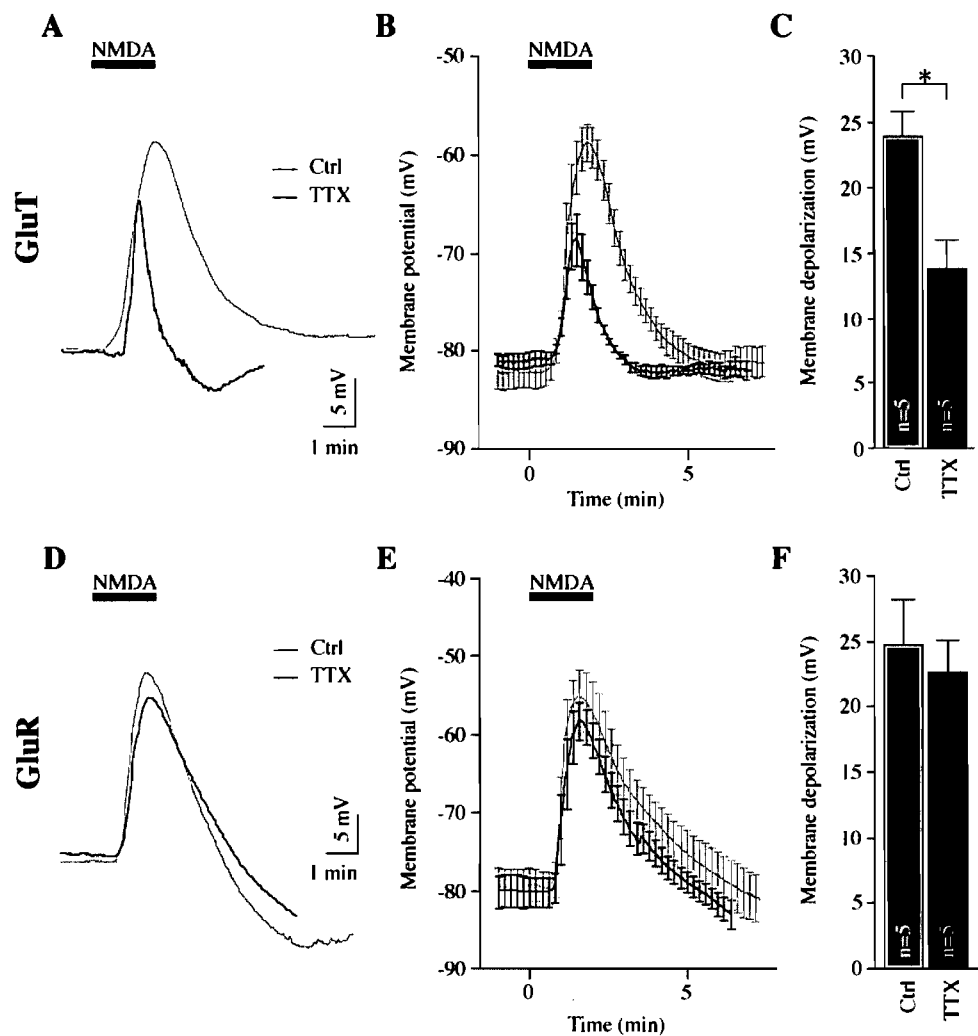


Fig. 7. Different mechanisms depolarize GluT and GluR astrocytes.

(A) Membrane potential change induced by NMDA (25 μ M, bar) in a single GluT astrocyte in control (grey) and in the presence of TTX (1 μ M, black). (B) Mean depolarizations \pm S.E.M. for 5 GluT cells in control (grey) and in TTX (black). (C) Bar graph showing the reduction in membrane depolarization induced by NMDA in GluT astrocytes in the presence of TTX (Student's paired *t* test, $p < 0.005$). (D-E) Example from a single GluR cell (D) and mean traces \pm S.E.M. from 5 GluR cells (E) in control (grey) and in the presence of TTX (1 μ M, black). (F) Bar graph

showing the similar NMDA-induced membrane depolarization in GluR cells in control and in TTX. * indicate $p < 0.005$.

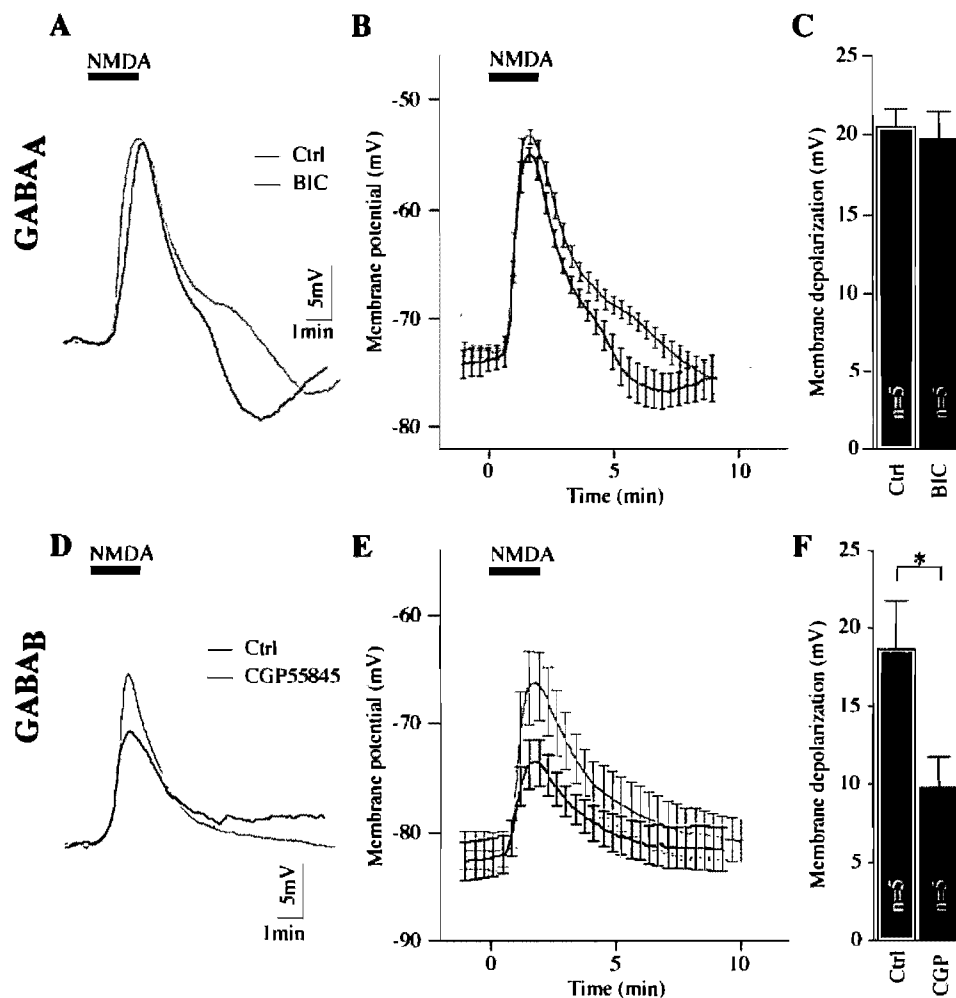


Fig. 8. GABA_B but not GABA_A receptors are involved in GluT cell depolarization.

(A) Membrane potential depolarization induced by NMDA (25 μ M, bar) in a single GluT astrocyte in control (grey) and in the presence of bicuculline (25 μ M, black). (B) Mean depolarizations \pm S.E.M. for 5 GluT cells in control (grey) and in bicuculline (black). (C) Bar graph showing similar peak depolarization of GluT astrocytes in control and in the presence of bicuculline. (D) Membrane potential changes induced by NMDA (25 μ M, bar) in a single GluT astrocyte in control

(grey) and in the presence of CGP55845 (2 μ M, black). (E) Mean depolarizations \pm S.E.M. for 5 GluT cells in control (grey) and in CGP55845 (black). (F) Bar graph showing the significant reduction in membrane depolarization induced by NMDA in GluT astrocytes in the presence of CGP55845. * indicates $p < 0.005$.

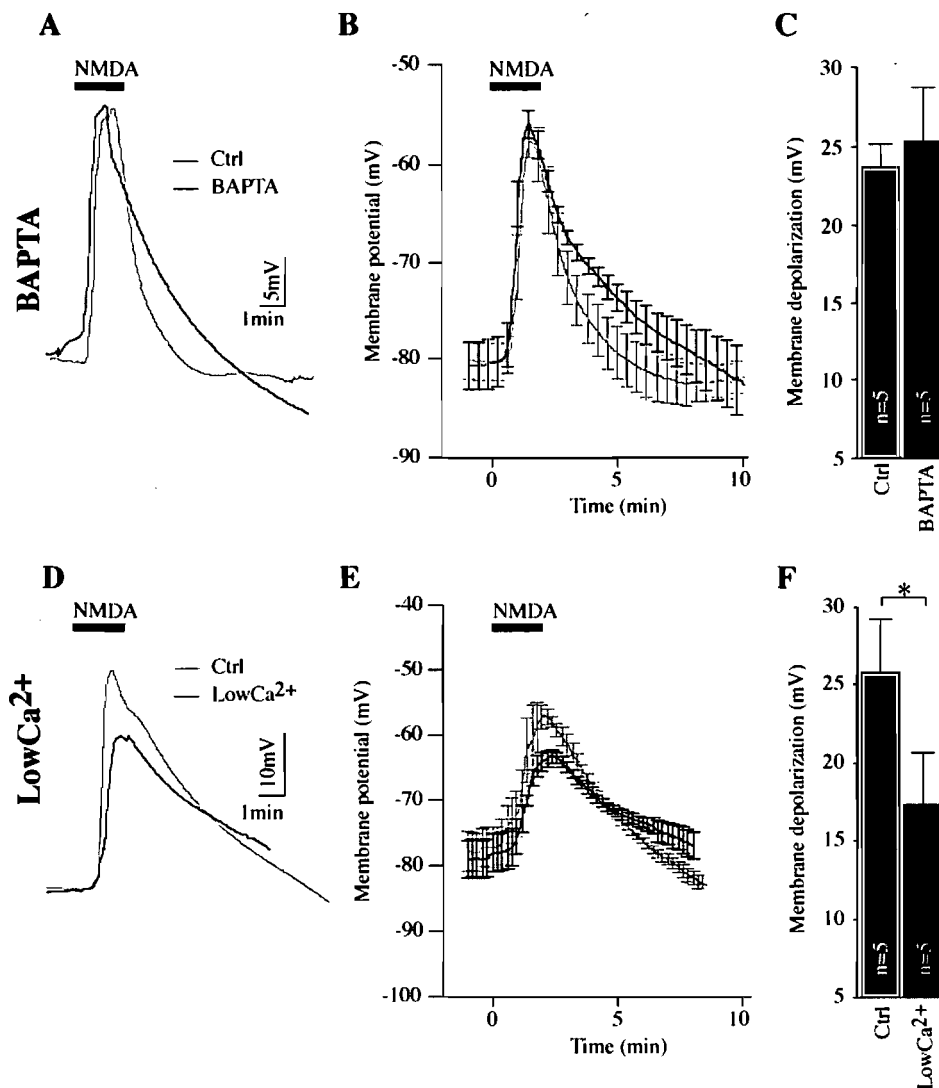


Fig. 9. Ca^{2+} entry is involved in GluT astrocyte depolarization.

(A) Membrane potential depolarization induced by NMDA (25 μM , bar) in a single GluT astrocyte during recording with intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA (36 mM, black) and in control (grey). (B) Mean depolarizations \pm S.E.M. for 5 control GluT cells (grey) and 5 GluT cells with intracellular BAPTA (black). (C) Bar graph showing that BAPTA had no effect on NMDA-induced depolarization of GluT astrocytes. (D) Membrane potential depolarization induced by NMDA (25

μM , bar) in a single GluT astrocyte in control (2mM, grey) and low (0.5 mM, black) extracellular Ca^{2+} concentration. (E) Mean depolarizations \pm S.E.M. for 5 GluT cells in control (grey) and low extracellular Ca^{2+} (black). (F) Bar graph showing the significant reduction of NMDA-induced depolarization in GluT astrocytes in low extracellular Ca^{2+} concentration.

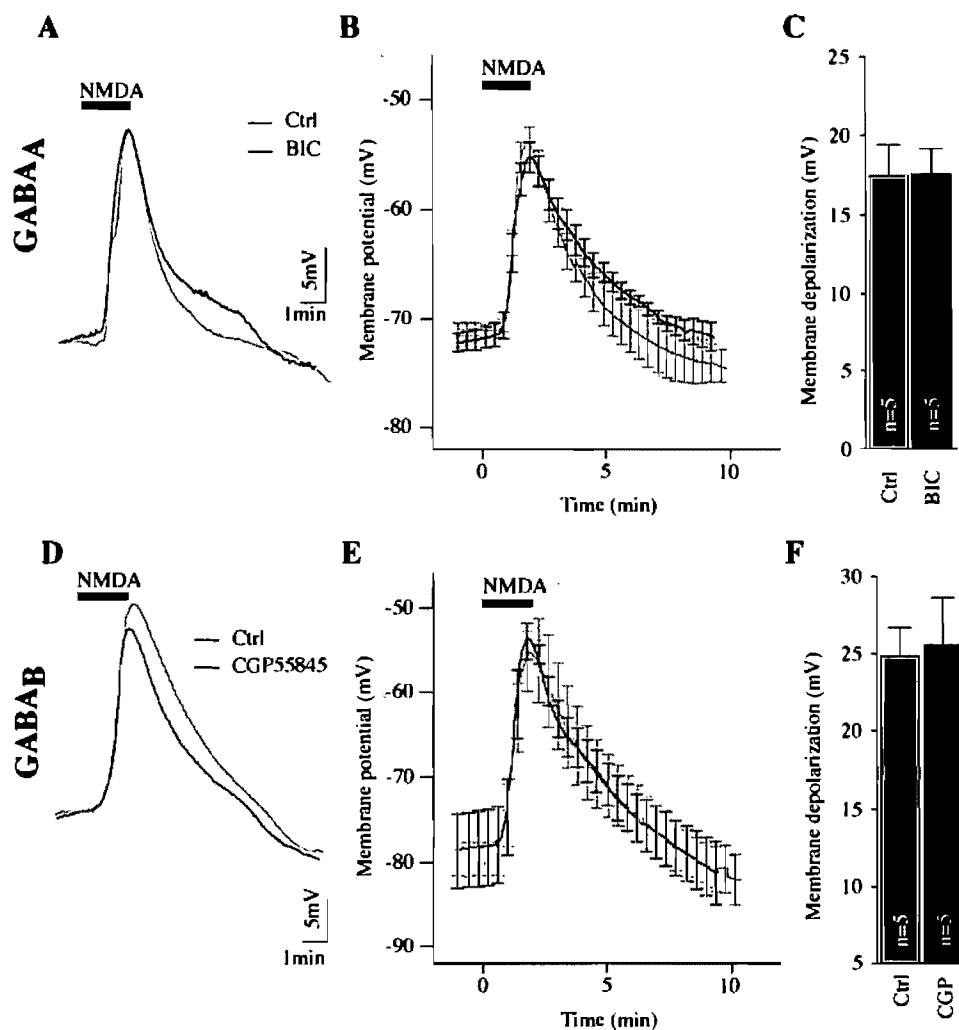


Fig. 10. GABA receptors are not required for GluR cell depolarization.

(A-B) Example of membrane potential traces from a GluR cell (A) and mean responses \pm S.E.M. from 5 GluR cells (B) in control (grey) and in the presence of bicuculline (25 μ M, black). (C) Bar graph showing no significant effect of bicuculline on NMDA-induced membrane depolarization in GluR astrocytes. (D-E) Example traces from a GluR cell (D) and mean traces \pm S.E.M. from 5 GluR cells (E) in control (grey) and in the presence of CGP55845 (2 μ M, black). (F) Bar

graph showing no significant effect of CGP55845 on NMDA-induced membrane depolarization in GluR cells.

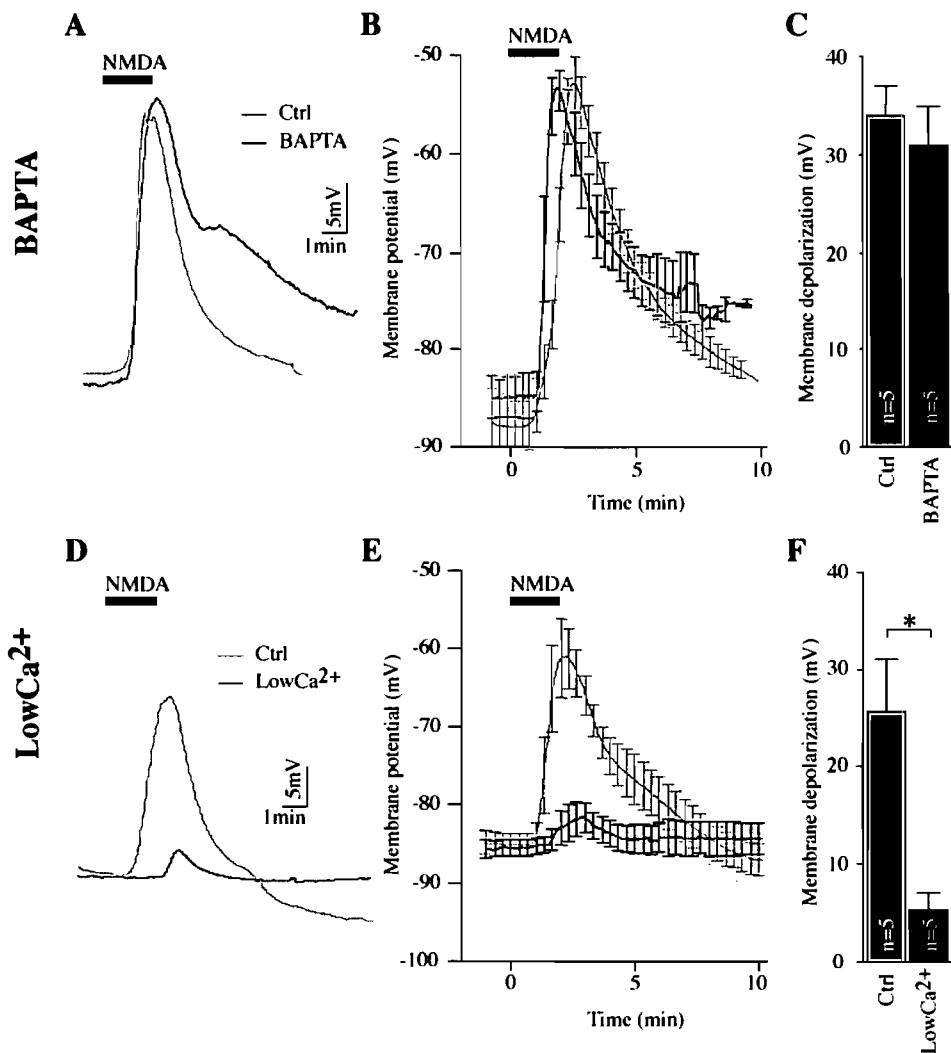


Fig. 11. Ca^{2+} entry is required for GluR astrocyte depolarization.

(A) Example of traces from a GluR cell recorded with control intracellular solution (grey) and a different GluR cell with intracellular BAPTA (36 mM, black). (B) Mean responses \pm S.E.M. from 5 GluR cells in control conditions (grey) and 5 GluR cells with intracellular BAPTA (black). (C) Bar graph showing no significant effect of BAPTA on NMDA-induced membrane depolarization in GluR astrocytes. (D-E) Traces from a GluR cell (D) and mean traces \pm S.E.M. for 5 GluR cells (E) in control conditions (grey) and in ACSF with low extracellular

Ca²⁺ concentration (0.5 mM, black). (F) Bar graph showing the significant reduction of NMDA-induced depolarization in GluR astrocytes by low extracellular Ca²⁺ concentration.

6 DISCUSSION GÉNÉRALE

6.1 BREF RAPPEL DE L'ÉTAT DE LA QUESTION.

Avant d'initier les travaux de cette thèse, il était acquis que les astrocytes sont des éléments fonctionnels de la synapse tripartite (Araque et al., 1999; Volterra et al., 2002) qui participent activement à la modulation homosynaptique comme la PLT (Kang et al., 1998; Nishiyama et al., 2002; Yang et al., 2003) et la suppression post-tétanique (Zhang et al., 2003). Par contre, aucune étude n'avait abordé la contribution des astrocytes à la plasticité hétérosynaptique. Dans ce contexte, la dépression hétérosynaptique apparaissait comme un outil expérimental idéal pour étudier le rôle des astrocytes dans les mécanismes de plasticité hétérosynaptique. Premièrement parce que la dépression hétérosynaptique a lieu en parallèle à la PLT, un phénomène dont la modulation par les astrocytes est déjà connue (Nishiyama et al., 2002; Yang et al., 2003). Deuxièmement parce que les paradigmes d'induction de la dépression hétérosynaptique (Manzoni et al., 1994) sont idéaux pour l'excitation des astrocytes (Latour et al., 2001; Auld et Robitaille, 2003). Troisièmement parce que les astrocytes libèrent de l'adénosine (ou sont précurseur, l'ATP), un neurotransmetteur inhibiteur induisant la dépression hétérosynaptique (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Zhang et al., 2003). Dans cette nouvelle perspective, nos travaux ont montré le rôle essentiel joué par les astrocytes dans la dépression hétérosynaptique. De nombreuses études ont confirmé par la suite la justesse de ces observations. Par exemple, l'équipe de Haydon a observé que la libération vésiculaire de gliotransmetteurs est un élément essentiel à la dépression hétérosynaptique, confirmant ainsi nos résultats (Pascual et al., 2005).

De plus, au début des travaux de cette thèse, la typologie astrocytaire (les différentes populations d'astrocytes de l'hippocampe et leurs propriétés respectives) était encore mal connue (Steinhauser et al., 1992; Steinhauser et al.,

1994). En considérant l'importance des récepteurs NMDA dans l'activation des astrocytes pendant la dépression hétérosynaptique et en tenant compte de l'absence de connaissances sur l'activation des astrocytes hippocampiques par le NMDA, il nous apparaissait particulièrement important d'étudier les propriétés d'activation de différentes populations d'astrocytes par l'application de NMDA. Nous avons donc entrepris de combler cette carence en distinguant les astrocytes de différentes populations sur la base de leurs propriétés distinctives. De nombreuses études confirment aussi la diversité de populations astrocytaires dans l'hippocampe (Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). Aujourd'hui, les astrocytes de l'hippocampe sont considérés une famille cellulaire si diversifiée qu'on n'arrive pas à cerner complètement ni son étendue ni sa complexité (Halassa et al., 2007b).

6.2 CE QUE CETTE THÈSE A MONTRÉ

Dans cette thèse, nous avons répondu aux objectifs particuliers que nous nous étions fixés lors de la détermination des buts. Nous avons ainsi montré que :

- 1) Les astrocytes de l'hippocampe sont des éléments essentiels du mécanisme d'induction de la dépression hétérosynaptique dépendante des récepteurs NMDA.
- 2) Les astrocytes sont activés par le NMDA selon des modalités qui sont particulières au sous-type cellulaire.

De façon plus globale, cette thèse a établi, pour la première fois, que les astrocytes contribuent à la plasticité purement hétérosynaptique dans l'hippocampe, une forme de modulation qui affecte un réseau neuronal étendu. De plus, cette thèse a démontré que des interactions complexes entre différents types cellulaires (neurones, interneurones et astrocytes), mais aussi entre différents neurotransmetteurs (glutamate, GABA, ATP et adénosine), sont à la base de la dépression hétérosynaptique. Cette thèse identifie aussi les astrocytes comme une cible des interneurones GABAergiques de l'hippocampe. Au niveau fonctionnel,

les travaux de la thèse suggèrent qu'en induisant la dépression hétérosynaptique, les astrocytes modulent par le fait même le transfert d'information dans l'hippocampe. De plus, en démontrant le rôle des astrocytes dans la dépression hétérosynaptique, cette thèse identifie un rôle des astrocytes dans les fonctions neurales complexes associées à la PLT comme la mémoire et l'apprentissage.

Une autre observation originale rapportée dans cette thèse est qu'une application de NMDA, qui stimule les neurones de l'hippocampe, a aussi des effets importants sur l'activation des astrocytes. Il a été constaté que le NMDA active les astrocytes de l'hippocampe par différents mécanismes qui sont spécifiques aux différents sous-types astrocytaires. Les différences dans les mécanismes d'activation entre différents types cellulaires concernent en particulier la contribution du calcium extracellulaire à la dépolarisation, la participation indirecte d'éléments GABAergiques et glutamatergiques dans l'activation des astrocytes, mais aussi des effets différentiels sur le couplage intercellulaire. De ces observations, cette thèse conclut que l'activation des astrocytes de l'hippocampe et du réseau glial par le NMDA engage des mécanismes hétérogènes et spécifiques au sous-type astrocytaire.

6.3 RÔLES DU NMDA : DE L'ACTIVATION ASTROCYTAIRE À L'INDUCTION DE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE.

La dépression hétérosynaptique nécessite l'activation de récepteurs NMDA et ce phénomène peut être mimé par l'application de NMDA (Manzoni et al., 1994). Nos travaux ont démontré des effets complexes de l'application du NMDA pendant l'activation des astrocytes et l'induction de la dépression hétérosynaptique. Premièrement, une partie de l'activation astrocytaire semble être un effet direct du NMDA. Deuxièmement, différentes modalités entrent en jeu lors de l'activation astrocytaire par l'application de NMDA. Troisièmement, une partie des effets du NMDA sur l'activation astrocytaire et la dépression synaptique sont produits

indirectement par un intermédiaire neuronal. Dans cette section nous allons discuter les implications de ces trois effets du NMDA dans le contexte de l'activation astrocytaire et l'induction de la dépression hétérosynaptique.

6.3.1 LES ASTROCYTES DE L'HIPPOCAMPE POSSÈDENT-ILS DES RÉCEPTEURS NMDA ?

Nos résultats révèlent au moins trois voies à la base de la complexité de l'activation des astrocytes par l'application de NMDA : une voie directe du NMDA sur les astrocytes, une voie indirecte engageant les neurones glutamatergiques et une voie indirecte engageant les neurones GABAergiques.

Deux résultats en particulier pointent vers un effet direct du NMDA sur les astrocytes de l'hippocampe : en présence de TTX pour bloquer l'activité neuronale, l'application de NMDA induit à la fois une dépolarisation membranaire et une réponse calcique astrocytaire. Nous croyons que ces résultats suggèrent fortement la présence sur les astrocytes de récepteurs NMDA fonctionnels capables de dépolariser la membrane et induire une élévation calcique. Cependant, des expériences supplémentaires d'amplification de l'ARN des récepteurs NMDA par PCR (*polymerase chain reaction*) (voir aussi section 6.9.5) sont nécessaires pour confirmer la présence de ces récepteurs et exclure la contribution de facteurs indirects tels que des récepteurs NMDA présynaptiques, qui pourraient activer des astrocytes par une relâche de glutamate insensible à la TTX. Par contre, il semble peu probable que des récepteurs NMDA présynaptiques puissent induire, à eux seuls et en présence de TTX, la libération massive de glutamate nécessaire pour causer dans les astrocytes des dépolarisations membranaires soutenues et de grande amplitude, des élévations calciques qui se propagent dans tout le corps cellulaire, des chutes de résistance membranaire et un couplage intercellulaire étendu.

La voie indirecte du NMDA engageant un neurone glutamatergique est révélée par un résultat en particulier : la dépolarisation des astrocytes de type GluT induite par

l'application de NMDA nécessite l'activation des transporteurs au glutamate. Ce résultat implique nécessairement une libération de glutamate en amont de l'activation astrocytaire. La présence de transporteurs au glutamate sur ce type d'astrocytes a été rapportée auparavant (Matthias et al., 2003).

Finalement, deux résultats en particulier pointent vers un effet indirect du NMDA engageant aussi les interneurons GABAergiques : dans les astrocytes de type GluT la dépolarisation membranaire et la réponse calcique induites par l'application de NMDA nécessitent l'activation de récepteurs GABA_B. Ces résultats suggèrent donc que la libération de GABA est une étape intermédiaire à l'activation d'un sous-type astrocytaire. La présence de récepteurs GABA_B sur certains astrocytes de l'hippocampe avait aussi été rapportée par l'équipe de Nedergaard (Kang et al., 1998).

Alors que la présence de certains récepteurs et transporteurs au glutamate sur les astrocytes est connue et documentée (Verkhratsky et al., 1998), l'observation de récepteurs NMDA directement sur les astrocytes de l'hippocampe est une nouveauté concernant la capacité de signalisation de ces cellules (Verkhratsky et Kirchhoff, 2007). Les récepteurs AMPA perméables au calcium et les récepteurs NMDA sont les seuls récepteurs ionotropes au glutamate qui peuvent permettre une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire (Verkhratsky et al., 1998). La présence de récepteurs NMDA peut induire des différences notables dans la façon dont la signalisation calcique est régulée dans les astrocytes. Premièrement, la perméabilité au Ca²⁺ des récepteurs NMDA est supérieure à celle des récepteurs AMPA perméables au calcium (Riedel et al., 2003), ce qui suggère que les récepteurs NMDA pourraient contribuer davantage à la signalisation calcique des astrocytes. Deuxièmement, la sensibilité des récepteurs NMDA au glutamate est supérieure à celle des récepteurs AMPA (Riedel et al., 2003), ce qui suggère que les récepteurs NMDA sont de meilleurs senseurs de glutamate et donc qu'ils seraient plus efficace pour détecter l'activité synaptique et pour intégrer le

transfert d'information. Troisièmement, puisque les astrocytes ont des variations de potentiel plus lentes que les neurones (Bordey et Sontheimer, 1997; McKhann et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003; Blomstrand et al., 2004; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006), les périodes pendant lesquelles le block Mg^{2+} est levé sont probablement aussi plus longues. Cette différence affecte directement les fenêtres d'activation des récepteurs NMDA. Concernant le block par le Mg^{2+} , plusieurs observations sur les propriétés des astrocytes dans le cortex suggèrent que l'activation de leurs récepteurs NMDA serait indépendante du voltage (Schipke et al., 2001), une propriété qui reste à être confirmée dans les astrocytes de l'hippocampe.

6.3.2 LE NMDA ACTIVE LES ASTROCYTES PAR DIFFÉRENTES MODALITÉS

Il existe une relation complexe entre les différentes voies recrutées par l'application de NMDA (voie directe, voie indirecte glutamatergique et voie indirecte GABAergique) et les différentes modalités d'activation des astrocytes (dépolérisation membranaire, réponse calcique, variations de résistance membranaire et couplage intercellulaire). Cette section détaille la contribution de chaque voie aux différentes modalités. Tout d'abord, il est important de préciser qu'il existe une hétérogénéité dans les voies recrutées pour l'activation des différents sous-types astrocytaires. Les trois voies activées par l'application de NMDA (directe, indirecte glutamatergique et indirecte GABAergique) contribuent à l'activation des astrocytes de type GluT tandis que seulement les deux premières voies (directe et indirecte glutamatergique) contribuent à l'activation des astrocytes de type GluR.

Dans les astrocytes de type GluT (Figure 25), la voie directe du NMDA contribue à la dépolérisation et à la réponse Ca^{2+} puisque ces réponses sont, en partie, insensibles à la TTX. Ces liens entre la voie directe du NMDA et les réponses cellulaires sont illustrés par les flèches vertes #1 et #2 (Figure 25). La voie indirecte glutamatergique du NMDA contribue à la dépolérisation et probablement

au couplage intercellulaire et à la réponse Ca^{2+} puisque ces réponses sont, en partie, sensibles à la TTX. De plus, la dépolarisation membranaire induite par le NMDA est sensible aux bloqueurs des transporteurs de glutamate. Ces relations entre la voie indirecte glutamatergique et les réponses cellulaires sont représentées par les flèches roses #3, #4 et #5. Finalement, la voie indirecte GABAergique du NMDA contribue à la dépolarisation membranaire, à la réponse calcique et possiblement au couplage intercellulaire, puisque ces réponses sont bloquées par la TTX et parce que la réponse calcique et la dépolarisation membranaire induites par l'application de NMDA sont sensibles aux antagonistes des récepteurs GABA_B . Ces liens entre la voie indirecte GABAergique du NMDA et les réponses cellulaires sont illustrés par les flèches bleues #6, #7 et #8. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les liens illustrés par les flèches #4, #5 et #7.

Dans le cas des astrocytes de type GluR (Figure 26), la voie directe du NMDA contribue à la dépolarisation puisque cette réponse est insensible à la TTX. De plus, comme cette dépolarisation membranaire dépend complètement de l'entrée de calcium il est possible que le calcium entrant par les récepteurs NMDA contribue à la réponse calcique induite par l'application de NMDA. Ces relations entre la voie directe et les réponses cellulaires sont illustrées par les flèches vertes #1 et #2 (Figure 26). Une contribution d'une relâche de glutamate insensible à la TTX (flèche rose #3) nécessitera plus d'expériences pour être confirmée.

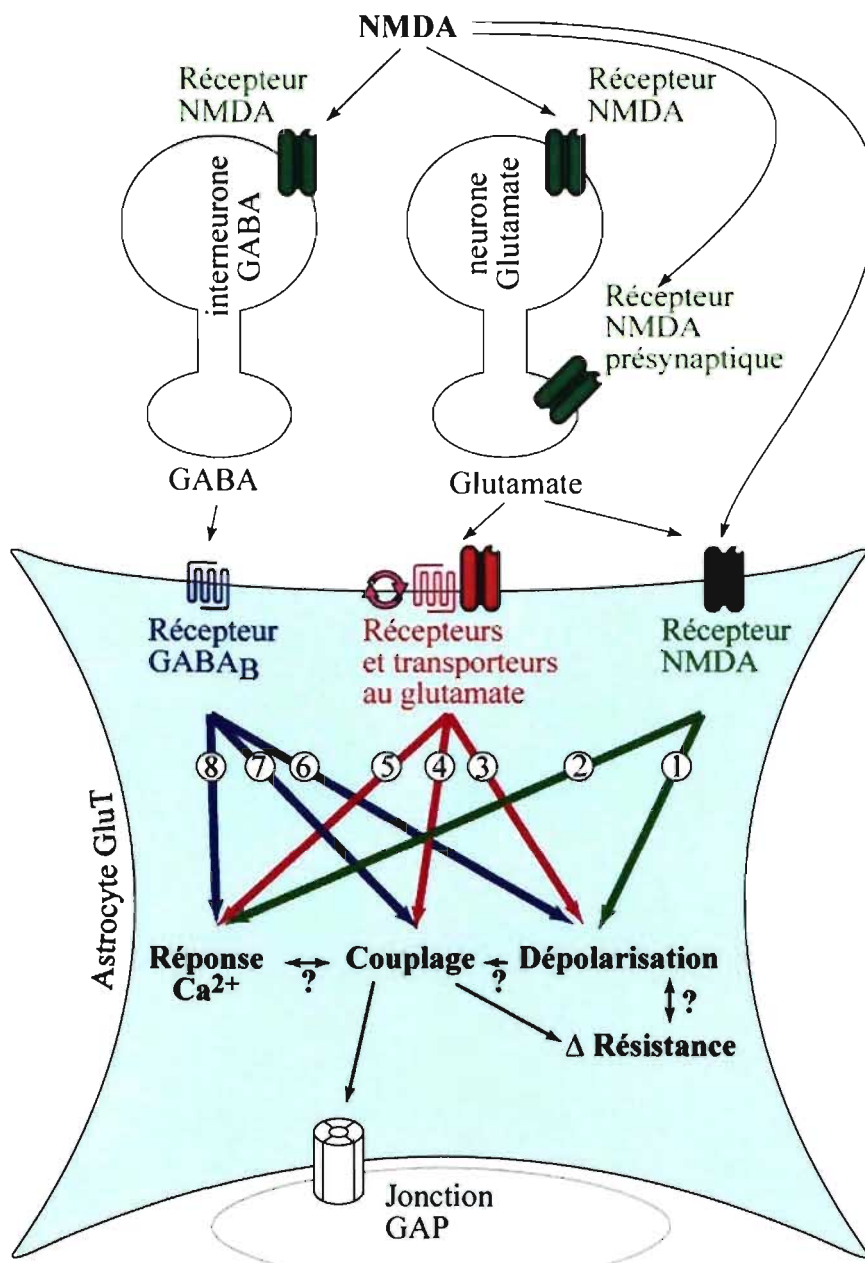


Figure 25. Relation entre les effets directs et indirects d'une application de NMDA et les différentes modalités d'activation des astrocytes GluT.

Dans les astrocytes GluT, les récepteurs GABA_B et NMDA ainsi que les transporteurs et les récepteurs au glutamate contribuent à l'activation. Les flèches de couleur numérotées identifient la contribution de chaque voie aux différentes modalités d'activation. Les possibles interactions entre différentes modalités d'activation sont identifiées par des flèches noires.

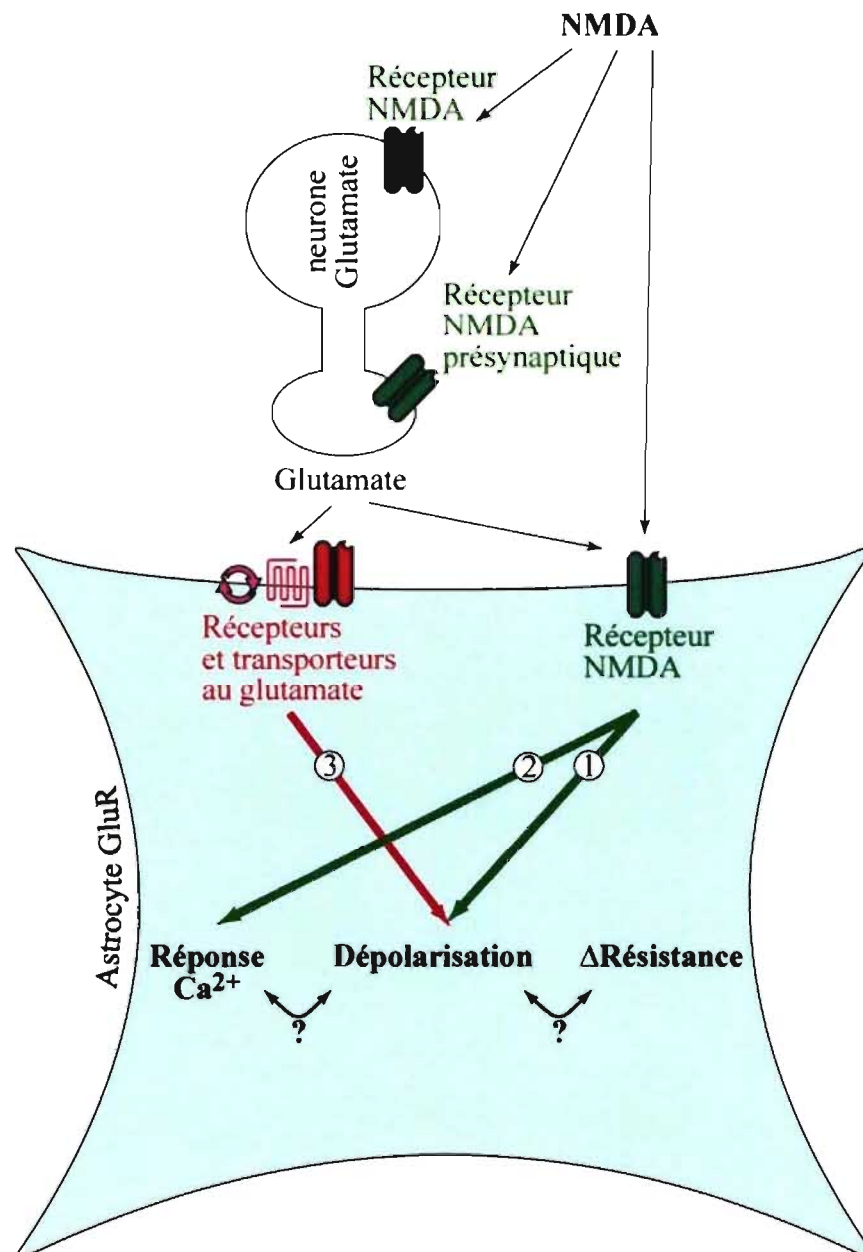


Figure 26. Relation entre les effets directs et indirects d'une application de NMDA et les différentes modalités d'activation des astrocytes GluR.

L'application de NMDA active les astrocytes GluR principalement par des récepteurs NMDA sur la cellule. Les flèches de couleur numérotées identifient la contribution de chaque voie aux différentes modalités d'activation. Les possibles interactions entre différentes modalités d'activation sont identifiées par des flèches noires.

6.3.3 INTÉGRATION DES DIFFÉRENTES MODALITÉS D'ACTIVATION.

Nos résultats indiquent que l'application de NMDA active les astrocytes de l'hippocampe par différentes modalités : la dépolarisation membranaire, la variation de résistance membranaire, la réponse calcique et, dans le cas des astrocytes de type GluT, le couplage intercellulaire. Dans cette section seront présentées plusieurs évidences montrant les possibles interactions entre certaines modalités d'activation.

Premièrement, l'entrée de Ca^{2+} lors de la dépolarisation membranaire par les récepteurs NMDA peut contribuer à la signalisation calcique. Il est peu probable que des canaux calciques dépendants du voltage membranaire soient activés lors de la dépolarisation et contribuent à la réponse calcique puisque ce mécanisme de signalisation semble être présent uniquement dans des conditions pathologiques (Duffy et MacVicar, 1994; Akopian et al., 1996). Deuxièmement, dans les astrocytes GluT spécifiquement, le couplage intercellulaire peut aussi contribuer à diffuser le signal calcique (Finkbeiner, 1992; Venance et al., 1995; Venance et al., 1997; Scemes et al., 1998; Blomstrand et al., 1999). Troisièmement, il est aussi connu que des changements de couplage ou la dépolarisation peuvent entraîner des variations de résistance membranaire (Blomstrand et al., 2004).

En convergeant vers la signalisation calcique, certaines modalités d'activation pourraient en fait contrôler différents paramètres de la signalisation calcique. Ainsi, la dépolarisation membranaire et le couplage intercellulaire pourraient contrôler, en fait, l'intensité et l'étendue du signal calcique dans le réseau astrocytaire. L'activation des astrocytes par différentes voies, récepteurs et modalités pourrait avoir des conséquences sur la cinétique, l'amplitude, la restriction locale ou la propagation globale du signal calcique qui active différentes protéines sensibles au calcium dans la cellule. Ces différences dans la signalisation calcique confèrent à l'astrocyte un outil efficace pour intégrer

finement l'activité neuronale et contribuer ainsi aux différents rôles dans le système nerveux dont la modulation de la transmission synaptique (Perea et Araque, 2005a, b, c).

6.3.4 LIENS ENTRE LES DIFFÉRENTES MODALITÉS D'ACTIVATION DES ASTROCYTES ET L'INDUCTION DE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

Nos résultats montrent que la réponse calcique astrocytaire est une étape nécessaire à l'induction de la dépression hétérosynaptique (Serrano et al., 2006). Qu'en est-il des autres modalités d'activation des astrocytes, la dépolarisation et le couplage intercellulaire ?

6.3.4.1 LA DÉPOLARISATION MEMBRANAIRE DES ASTROCYTES EST-ELLE NÉCESSAIRE À L'INDUCTION DE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

Nous avons suggéré (voir section 6.3.3) que la dépolarisation, en permettant une entrée de Ca^{2+} par les récepteurs NMDA, peut contribuer à la réponse calcique. Cependant, un résultat en particulier suggère que la dépolarisation membranaire ne contribue pas directement à la dépression hétérosynaptique : l'injection de BAPTA qui bloque la réponse calcique dans les astrocytes et la dépression hétérosynaptique n'affecte pas la dépolarisation membranaire des astrocytes induite par le NMDA. Cette observation suggère que, si la dépolarisation membranaire joue un rôle dans la dépression hétérosynaptique, celui-ci est en amont de la réponse calcique.

6.3.4.2 LE COUPLAGE DES ASTROCYTES EST-IL NÉCESSAIRE À L'INDUCTION DE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

Nos résultats montrent qu'un réseau d'astrocytes est activé pendant la dépression hétérosynaptique. Plusieurs indices suggèrent que le couplage intercellulaire et la dépression hétérosynaptique sont intimement liés : lorsqu'une dose élevée de BAPTA est injectée dans le syncytium à travers un seul astrocyte, il en résulte que l'élévation calcique dans les astrocytes avoisinants est bloquée et que l'induction de la dépression hétérosynaptique est empêchée. De plus, on observe une corrélation

directe entre l'étendue du couplage astrocytaire et le degré de dépression mesuré dans chaque expérience. Ces observations suggèrent donc que le couplage d'astrocytes en un syncytium étendu joue un rôle dans la dépression hétérosynaptique. Afin de confirmer si la dépression hétérosynaptique est affectée lorsque le couplage entre astrocytes est empêché, davantage d'expériences devront être réalisées. Étant donné la spécificité questionnable des drogues agissant sur les jonctions GAP, il semble plus approprié d'utiliser des souris transgéniques qui n'expriment pas les connexines typiquement astrocytaires (Cx43 et Cx30) (Naus et al., 1997; Scemes et al., 1998; Dermietzel et al., 2000; Rouach et al., 2000).

6.3.5 LES ASTROCYTES DE TYPE GLUT INDUISENT LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE

L'un des principaux résultats de cette thèse est que l'activation calcique des astrocytes est une étape essentielle à l'induction de la dépression hétérosynaptique. Sachant que deux populations d'astrocytes coexistent dans la couche *radiatum* de la région CA1 de l'hippocampe, nous nous sommes questionné sur les rôles respectifs des deux types d'astrocytes dans la dépression hétérosynaptique.

Les deux populations d'astrocytes, les cellules de type GluT et celles de type GluR, peuvent être différenciées par des propriétés comme la relation courant/voltage membranaire, la morphologie générale de la cellule et la fluorescence de la GFAP-GFP. Nous avons constaté que ces deux populations cellulaires peuvent aussi être différenciées par leurs mécanismes d'activation spécifiques. Afin de circonscrire ces différences, nous avons comparé les propriétés de l'activation par le NMDA de ces deux populations d'astrocytes par rapport aux propriétés d'induction de la dépression hétérosynaptique. Les astrocytes de type GluT ont en commun avec la dépression hétérosynaptique une activation qui engage les récepteurs de type GABA_B, un phénomène de couplage astrocytaire et un rôle significatif du calcium dans l'activation (Figure 27).

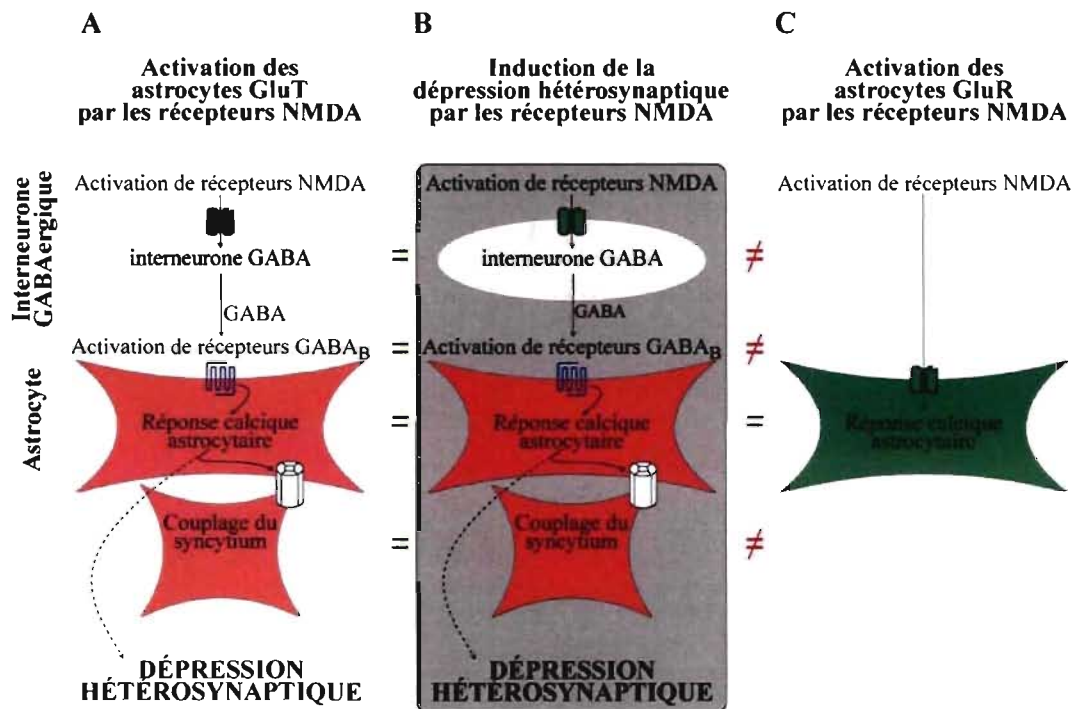


Figure 27. Comparaison entre les propriétés d'activation des astrocytes de type GluT et de type GluR par rapport aux propriétés d'induction de la dépression hétérosynaptique.

A) L'activation des astrocytes GluT par les récepteurs NMDA et B) l'induction de la dépression hétérosynaptique ont en commun le recrutement d'interneurones inhibiteurs, la relâche de GABA, l'activation de récepteurs GABA_B et la réponse calcique dans les astrocytes. C) En comparaison, l'activation des astrocytes de type GluR ne présente pas les mêmes propriétés que la dépression hétérosynaptique, mise à part l'élévation calcique.

L'activation des astrocytes de type GluR, qui ne se trouvent pas couplés, ne dépend pas des récepteurs de type GABA_B (Figure 27). Nos résultats suggèrent donc que les astrocytes de type GluT sont les astrocytes impliqués dans l'induction de la dépression hétérosynaptique. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que les astrocytes de type GluR jouent un rôle dans la dépression hétérosynaptique. Leur contribution à la dépression hétérosynaptique pourrait être différente de celle des astrocytes de type GluT et leur activation indépendante des récepteurs GABA_B. Une des hypothèses que l'on peut émettre c'est que pendant la dépression

hétérosynaptique, les astrocytes de type GluR ont un rôle plus local alors que les astrocytes GluT jouent un rôle plutôt étendu grâce au syncytium.

6.4 INTERACTIONS NEURONE-GLIE, SYNCYTIUM ASTROCYTAIRE ET DÉPRESSION HÉTÉRO-SYNAPTIQUE

Les travaux de l'équipe de Nicoll sur la dépression hétérosynaptique avaient démontré que ce phénomène de plasticité est le résultat d'une série d'interactions (Manzoni et al., 1994). Aux conclusions des études précédentes nous avons ajouté que les interactions qui soutiennent la dépression hétérosynaptique possèdent, en fait, un niveau de complexité supérieur : les interactions neurone-glie (Serrano et al., 2006). Nous pouvons résumer les trois principaux niveaux d'interactions présents lors de la dépression hétérosynaptique comme étant : 1) l'interaction entre les terminaisons présynaptiques stimulées et les interneurons, 2) l'interaction entre les interneurons et le réseau astrocytaire, 3) l'interaction entre le réseau astrocytaire et les terminaisons présynaptiques non-stimulées.

Cette section présente, premièrement, les interactions entre le syncytium astrocytaire et différentes formes de plasticité synaptique; deuxièmement, le syncytium astrocytaire et sa contribution au contraste synaptique dans la dépression hétérosynaptique; troisièmement, le lien entre les limites du syncytium astrocytaire et l'étendue de la dépression hétérosynaptique; quatrièmement, la relation numérique entre les astrocytes, les synapses et la dépression hétérosynaptique et, cinquièmement, les différentes interactions neurone-glie dans deux formes de dépression hétérosynaptique.

6.4.1 SYNCYTIUM ASTROCYTAIRE ET PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

En plus des trois niveaux d'interaction entre les réseaux neuronaux et astrocytaires (terminaisons présynaptiques – interneurons, interneurons – réseau astrocytaire, réseau astrocytaire – terminaisons présynaptiques), les travaux de cette thèse

indiquent que le couplage et l'interaction des astrocytes en un réseau étendu est un élément important de la dépression hétérosynaptique. Les interactions neurone-glie rapportées dans la littérature font état de différentes formes de plasticité qui ne nécessitent pas nécessairement l'intervention d'un syncytium (Figure 28 A et B). La modulation de l'activité d'une seule synapse entre les collatérales de Schaffer et les pyramidales de la région CA1 par un astrocyte est un exemple de régulation locale de la transmission excitatrice qui forme une boucle de rétroaction homosynaptique (Zhang et al., 2003) (Figure 28 A). Les astrocytes forment aussi des interactions locales avec la transmission inhibitrice produite par les interneurons de la région CA1 de l'hippocampe et modulent la libération de GABA dans une boucle de rétroaction homosynaptique (Kang et al., 1998) (Figure 28 B). Un exemple d'interaction à la fois locale et étendue est la synchronisation de plusieurs cellules pyramidales par un astrocyte qui peut contribuer à connecter des groupes de neurones distincts (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004) (Figure 28 C). L'intégration d'un réseau d'astrocytes dans la dépression hétérosynaptique a des conséquences par rapport au comportement d'un astrocyte isolé. Les interactions étendues entre le réseau astrocytaire et différents éléments neuronaux nécessaires pour générer la dépression hétérosynaptique suggèrent principalement que le réseau modulé est plus vaste que dans les formes de modulation locale ou monocellulaire. Il est probable que des modulations locales soient sous-jacentes à la modulation étendue. De plus, il est envisageable que ces modulations locales ne soient pas toutes de même nature, une possibilité qui est considérée à la section 6.7.1. Un exemple manifeste de cette différence sont les modulations locales dans le cadre de la dépression hétérosynaptique (voir section 6.4.2) qui forment probablement le contraste centre-périphérie (Serrano et al., 2006) (Figure 28 D et Figure 29).

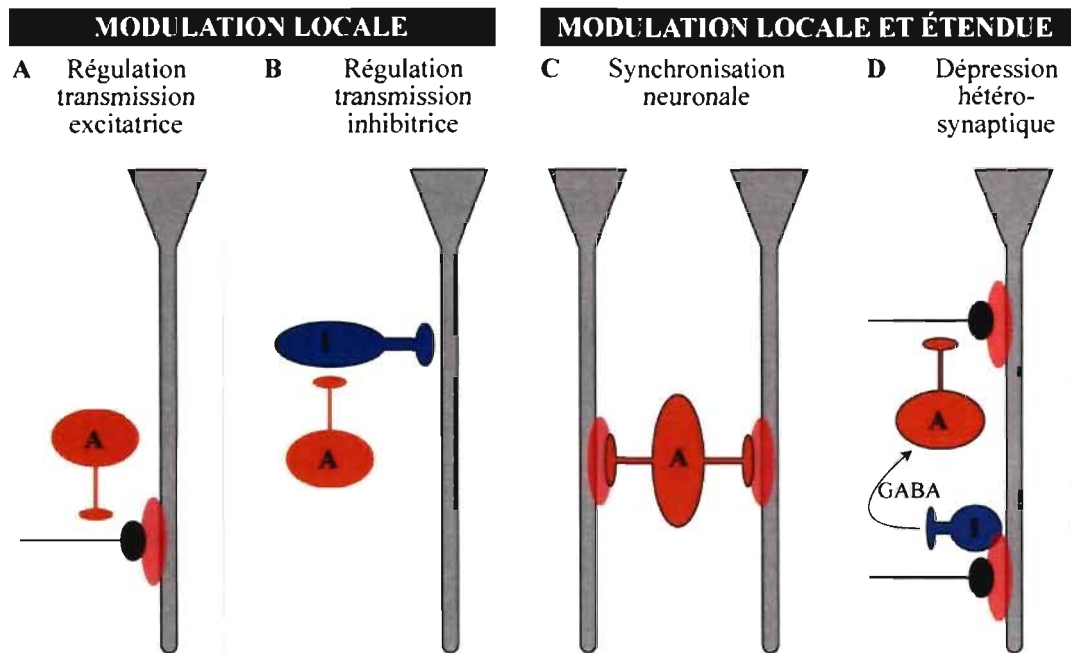


Figure 28. Des interactions locales et étendues entre astrocytes et neurones sont à la base de différentes formes de plasticité synaptique.

A) Modulation locale par un astrocyte d'une seule synapse excitatrice entre les collatérales de Schaffer et les pyramidales de la région CA1. Adapté de (Zhang et al., 2003).

B) Modulation locale d'une synapse inhibitrice par un astrocyte dans une boucle de rétroaction homosynaptique. Adapté de (Kang et al., 1998).

C) Modulation locale et étendue lors de la synchronisation de l'activité de plusieurs cellules pyramidales par un astrocyte. Adapté de (Fellin et al., 2004).

D) Nos travaux ont montré que les astrocytes peuvent interagir de façon locale et étendue avec plusieurs éléments cellulaires impliquant différentes synapses lors de la dépression hétérosynaptique. Adapté de (Serrano et al., 2006). A = astrocyte, I = interneurone.

6.4.2 LE SYNCYTIUM ASTROCYTAIRE ÉTABLIT UN CONTRASTE SYNAPTIQUE DE TYPE CENTRE-PÉRIPHÉRIE PENDANT LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE

Différents rôles ont été associés à la dépression hétérosynaptique dans l'hippocampe (Dunwiddie et Lynch, 1978) (voir aussi section 2.4.3) : le maintien de l'équilibre dans les "poids" synaptiques, la prévention de la saturation des synapses par la PLT, la réduction du bruit synaptique aux synapses non stimulées

et l'augmentation du contraste entre l'activité des synapses potentialisées et des synapses non stimulées.

En considérant les résultats de cette thèse on peut émettre l'hypothèse que la dépression hétérosynaptique possède un rôle additionnel. Les interactions qui sous-tendent la dépression hétérosynaptique semblent former un contraste centre-périphérie où les synapses potentialisées sont entourées d'une couronne de synapses déprimées. Il est possible qu'un tel contraste centre-périphérie puisse moduler considérablement l'activation synaptique du réseau neuronal. Par exemple, le contraste centre-périphérie établi par la dépression hétérosynaptique pourrait limiter le nombre et la localisation des cellules cibles activées par les collatérales de Schaffer (Andersen, 2007). En contribuant à ce contraste synaptique, le syncytium astrocytaire participe à la modulation de l'activité neuronale.

La figure 29 représente un réseau d'interneurones GABAergiques (cellules bleues) associé à un réseau d'astrocytes (cellules vertes) qui sont distribués autour de trois faisceaux de collatérales de Schaffer contactant les cellules pyramidales de la région CA1 (cellules roses). La stimulation à haute fréquence d'un sous-groupe de collatérales de Schaffer induit la PLT (voie stimulée, fibres rouges), puis active les interneurones GABAergiques par les récepteurs NMDA. Le GABA libéré localement (nuage jaune) active les astrocytes par les récepteurs GABA_B, induit une réponse calcique dans les astrocytes, puis initie la libération d'ATP. L'ATP est ensuite dégradé en adénosine et produit une inhibition présynaptique des collatérales de Schaffer, ce qui provoque la dépression hétérosynaptique (voie déprimée, fibres bleues). En interagissant avec le réseau d'interneurones, les astrocytes génèrent ainsi un contraste de forme centre-périphérie entre l'efficacité synaptique de la voie potentialisée (centre) et celle des synapses déprimées en périphérie (périphérie).

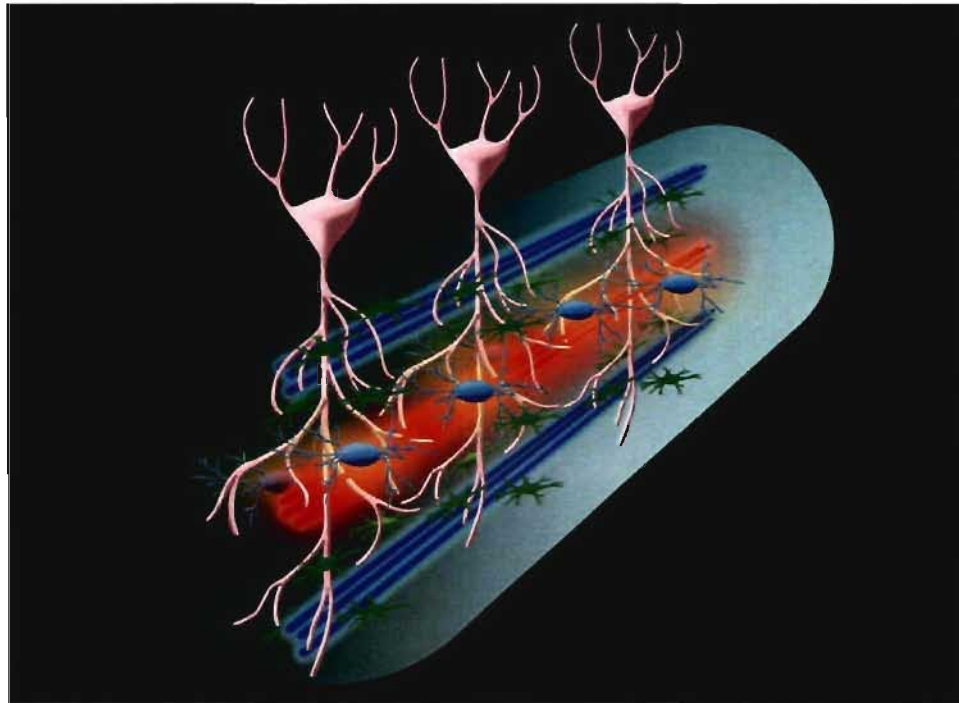


Figure 29. Schéma du contraste synaptique centre-périphérie dans la dépression hétérosynaptique.

L'interaction entre les réseaux d'astrocytes (cellules vertes) et d'interneurones (cellules bleues) dans la dépression hétérosynaptique forme un contraste synaptique de type centre-périphérie entre la voie potentialisée (centre, rouge) et les synapses déprimées en périphérie (périphérie, bleu).

6.4.3 LIMITES DU SYNCYTIUM ASTROCYTAIRE ET ÉTENDUE DE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE

Quelle étendue peut atteindre la dépression hétérosynaptique ? Une donnée importante pour comprendre les limites physiques de la dépression hétérosynaptique est l'étendue du réseau astrocytaire lui-même. Les connexions entre astrocytes ne semblent pas être uniformes à travers l'hippocampe. Ainsi, les astrocytes de la couche *radiatum* sont faiblement connectés avec ceux de la couche *oriens* (D'Ambrosio et al., 1998; Serrano et al., 2006). En l'absence de communication entre astrocytes de différentes couches, on peut supposer que la dépression hétérosynaptique ne se propage pas aux autres couches de l'hippocampe à moins d'utiliser un mécanisme de communication extracellulaire ou diffusible (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Wang et al., 2000).

L'implication des interneurons GABAergiques avec leur grande arborisation axonale a probablement des conséquences au niveau de l'étendue de la dépression hétérosynaptique. En absence d'interneurones GABAergiques, on peut supposer que l'activation des astrocytes serait uniquement induite par le glutamate libéré des collatérales de Schaffer stimulées. Dans une telle situation, l'étendue de la dépression hétérosynaptique dépendrait uniquement du couplage entre les astrocytes. En intercalant un interneurone GABAergique dans la cascade d'induction de la dépression hétérosynaptique, l'étendue d'activation des astrocytes ainsi que l'étendue de la dépression hétérosynaptique sont augmentées.

Cette limite du syncytium astrocytaire dans la couche *radiatum* ne signifie pas que la dépression hétérosynaptique soit un mécanisme de plasticité synaptique spécifique aux collatérales de Schaffer. La dépression hétérosynaptique a été classiquement étudiée entre deux sous-groupes de collatérales de Schaffer dans la couche *radiatum*, mais des études ont aussi montré que la dépression hétérosynaptique peut aussi affecter les voies temporoammonique ou commissurale démontrant sa présence dans des voies différentes des collatérales de Schaffer (Lynch et al., 1977; Dunwiddie et Lynch, 1978).

6.4.4 RELATION NUMÉRIQUE ENTRE LES ASTROCYTES, LES SYNAPSES ET LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

6.4.4.1 COMPARAISON ENTRE L'ÉTENDUE DU SYNCYTIUM ASTROCYTAIRE ET LES SYNAPSES AFFECTÉES PAR LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE

Il a été estimé que, dans la région CA1 de l'hippocampe, il y a environ 213 synapses dans un volume de tissu de $100 \mu\text{m}^3$ (Kirov et al., 1999). Quant aux astrocytes, l'ensemble de leurs prolongements membranaires occupe un volume d'environ $66000 \mu\text{m}^3$ (Bushong et al., 2002). On peut alors estimer qu'un seul astrocyte peut contacter à lui seul environ 140580 synapses ($66000 \mu\text{m}^3 \times \frac{213 \text{synapses}}{100 \mu\text{m}^3}$). Puisque les prolongements membranaires des astrocytes contactent uniquement 57% des synapses présentes (Ventura et Harris,

1999), on peut estimer qu'un astrocyte pourrait contacter en réalité environ 80130 synapses. Nous avons observé dans les expériences de la dépression hétérosynaptique que le syncytium astrocytaire activé peut atteindre jusqu'à 164 astrocytes. Dans cette expérience, ce syncytium astrocytaire pouvait contacter un maximum de 13 millions de synapses (164 astrocytes X 80130 synapses / astrocyte = 13141320 synapses), soit probablement une interaction suffisante pour affecter l'activité synaptique d'un réseau neuronal important. Une étude récente montre d'ailleurs qu'un seul astrocyte dans le cortex peut contacter jusqu'à huit corps cellulaires neuronaux ou 600 dendrites (Halassa et al., 2007a). L'ensemble de ces données suggère donc que les interactions entre les astrocytes et les neurones peuvent avoir lieu à trois niveaux différents. Premièrement, les modulations au niveau d'une seule synapse semblent être produites localement par un microdomaine astrocytaire qui forme un compartiment relativement indépendant capable d'interactions autonomes (Figure 30 A). Deuxièmement, les interactions peuvent être coordonnées par un astrocyte et affecter des centaines de dendrites (Figure 30 B). Finalement, en considérant toute l'étendue du syncytium astrocytaire, le nombre de synapses contactées est probablement suffisant pour modifier globalement le transfert et la sortie d'information de l'hippocampe comme nous l'avons observé dans le cas de la dépression hétérosynaptique (Figure 30 C).

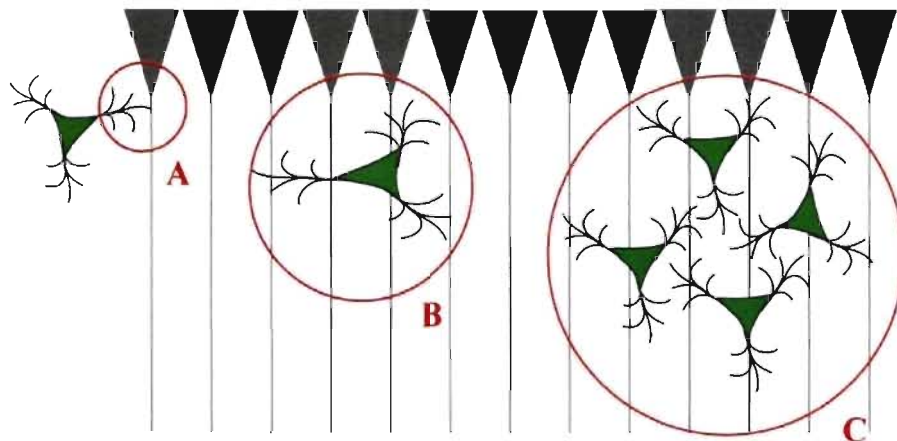


Figure 30. Trois niveaux d'interactions entre astrocytes et neurones.

- A) Interactions locales entre un microdomaine astrocytaire et une synapse.
 B) Interactions entre un astrocyte et plusieurs neurones. C) Interactions étendues entre un réseau astrocytaire et un réseau neuronal.

6.4.4.2 COMBIEN D'ASTROCYTES SONT NÉCESSAIRES POUR PRODUIRE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

La couche *radiatum* mesure environ 450 μm dans la région CA1 de l'hippocampe (Andersen, 2007). L'ensemble des prolongements membranaires d'un astrocyte occupe environ 50 μm et ne chevauche pas les astrocytes environnants (Bushong et al., 2002). Selon ces données, un réseau "linéaire" de seulement 9 astrocytes (450 μm / 50 μm / astrocyte) connectés un à la suite de l'autre est suffisant pour couvrir toute la couche *radiatum* et donc probablement suffisant pour induire la dépression hétérosynaptique dans toute cette région. Le résultat de ce calcul contraste avec les valeurs obtenues à la section précédente (9 astrocytes comparés avec 164 astrocytes) mais suggère qu'un nombre réduit d'astrocytes est capable de contrôler un grand nombre de synapses et un réseau neuronal étendu comme celui que l'on retrouve dans la couche *radiatum* de la région CA1 de l'hippocampe.

6.4.5 DEUX FORMES DE DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ASTROCYTAIRE

Nos résultats montrent que, pendant la dépression hétérosynaptique dans la région CA1 de l'hippocampe, l'activation des astrocytes est produite par des récepteurs GABA_B (Serrano et al., 2006). L'équipe de Haydon a aussi observé que, lorsque la région CA1 est isolée des connexions provenant de la région CA3, l'activation des astrocytes pendant la dépression hétérosynaptique est produite par les récepteurs mGluR5 et P2 (tel que révélé par un antagoniste à large spectre des récepteurs P2X et P2Y) (Kubera et al., 2007). Ceci suggère qu'en absence des connexions entre la région CA3 et CA1, les astrocytes sont activés par le glutamate et l'ATP provenant probablement des terminaisons présynaptiques. Ceci suggère aussi que les connexions entre la région CA3 et CA1 sont importantes pour l'activation des interneurons et pour la libération de GABA dans la région CA1. Les particularités des deux phénomènes (GABAergiques et glutamatergiques) suggèrent qu'ils pourraient être complémentaires et parallèles. Ainsi, les interactions

glutamatergiques seraient plutôt locales avec le site de libération du glutamate par les synapses stimulées tandis que les interactions GABAergiques seraient plutôt étendues. La présence de ces deux formes d'activation astrocytaire pendant la dépression hétérosynaptique démontre la complexité de la contribution astrocytaire à ce phénomène de plasticité synaptique.

6.5 QU'ELLE EST L'IMPORTANCE DU RÉSEAU GABAERGIQUE DANS L'ACTIVATION DES ASTROCYTES ET DANS LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

Les sources du GABA dans l'activation des astrocytes et l'induction de la dépression hétérosynaptique peuvent être soit les interneurons locaux, soit une projection GABAergique extrinsèque à l'hippocampe (Andersen, 2007). Étant donné le nombre réduit de synapses provenant de projections extrinsèques GABAergiques (Andersen, 2007), il est peu probable qu'elles puissent produire une activation massive des astrocytes comme celle qui a lieu pendant la dépression hétérosynaptique. De plus, les expériences de l'équipe de Nicoll suggèrent que la dépolarisation des interneurons locaux est nécessaire à ce mécanisme de plasticité synaptique (Manzoni et al., 1994). Les interneurons GABAergiques locaux semblent donc être la source de GABA dans l'induction de la dépression hétérosynaptique.

Un des rôles des interneurons GABAergiques dans la dépression hétérosynaptique est certainement de contribuer à l'activation des astrocytes. Il est connu que le GABA peut exciter les astrocytes par les récepteurs GABA_A (Steinhauser et al., 1994; Fraser et al., 1995), mais les mécanismes d'activation des astrocytes par les récepteurs GABA_B restent peu connus.

6.5.1 COMMENT LES RÉCEPTEURS GABA_B INDUISENT DES ÉLEVATIONS CALCIFIQUES DANS LES ASTROCYTES ?

Les récepteurs GABA_B peuvent induire des élévations calciques dans les astrocytes de l'hippocampe (Kang et al., 1998). Dans cette étude de l'équipe de Nedergaard, l'élévation calcique induite par les récepteurs GABA_B était produite par une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire. Dans les neurones, les récepteurs GABA_B sont reconnus pour inhiber les canaux calciques (Couve et al., 2000) et, donc, il semble paradoxal qu'ils puissent induire une élévation calcique dans les astrocytes. Des études sur des cultures primaires de neurones corticaux ont cependant démontré que les récepteurs GABA_B ont la capacité d'interagir avec les canaux calciques opérés par les réserves calciques (*store-operated channels*) (Figure 31) (New et al., 2006). Il semblerait que les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G puissent interagir avec la phospholipase C β qui produit l'IP₃. L'IP₃ active un récepteur spécifique intracellulaire sur les réserves calciques et induit une première libération de calcium permettant l'ouverture des canaux calciques opérés par les réserves calciques ce qui induit l'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire (New et al., 2006).

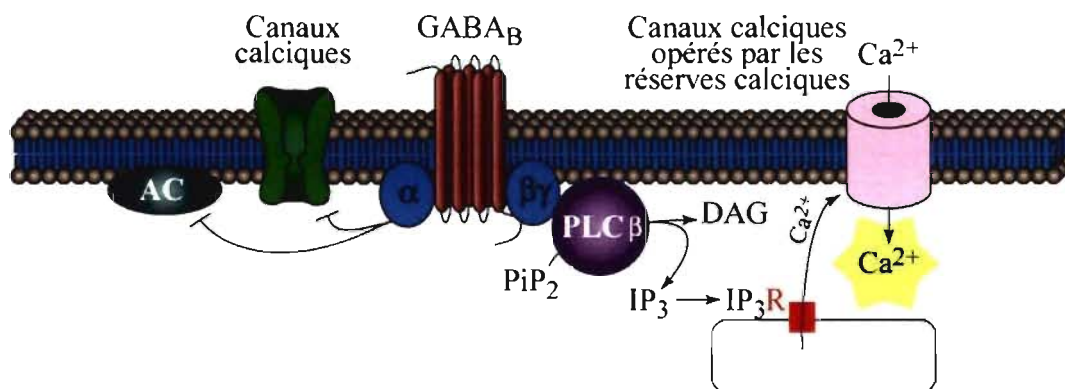


Figure 31. Interaction entre les récepteurs GABA_B et les canaux calciques opérés par les réserves calciques dans des cellules en culture.

Les récepteurs GABA_B, via les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G et la phospholipase C β (PLC β), produisent l'IP₃ qui induit la libération de calcium activant les canaux calciques opérés par les réserves calciques. Adapté de (New et al., 2006).

À notre connaissance, aucune étude n'a rapporté la présence de cette capacité des récepteurs GABA_B d'induire des élévations de Ca²⁺ produites par des canaux calciques opérés par les réserves calciques dans des neurones, interneurones ou astrocytes de l'hippocampe. Il serait donc particulièrement intéressant de vérifier si ce mécanisme contribue à l'activation calcique des astrocytes pendant la dépression hétérosynaptique. Le fait que les récepteurs GABA_B induisent des élévations calciques dans les astrocytes suggère que, contrairement aux neurones, la libération de GABA par les interneurones et l'activation des récepteurs GABA_B est une voie excitatrice pour les astrocytes. De plus, cette voie est possiblement une forme supplémentaire de sensibilité des astrocytes à la transmission inhibitrice. Cette voie d'activation des astrocytes joue aussi un rôle dans la PLT de la transmission inhibitrice (Kang et al., 1998). Finalement, on peut conclure que les astrocytes participent non seulement à la transmission et à la plasticité synaptique excitatrice mais qu'ils sont aussi essentiels à la transmission synaptique inhibitrice.

6.5.2 QUELS SONT LES INTERNEURONES IMPLIQUÉS DANS L'ACTIVATION DES ASTROCYTES LORS DE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

Les rôles des récepteurs GABA_B dans l'activation des astrocytes et dans la dépression hétérosynaptique impliquent que les interneurones GABAergiques sont essentiels à ces deux phénomènes. Il est possible d'identifier plusieurs types d'interneurones qui pourraient être compatibles avec un rôle dans la dépression hétérosynaptique en nous basant sur deux critères : ces interneurones doivent être activés par une stimulation des collatérales de Schaffer dans la couche *radiatum* de la région CA1 de l'hippocampe et doivent nécessairement libérer du GABA dans la couche *radiatum* de la région CA1 pour activer les astrocytes. Nous avons identifié 4 types d'interneurones qui répondent à ces critères : les interneurones bistratifiés (PV+, somatostatine+, NPY+, GABA_A+, CCK-), les interneurones associés aux collatérales de Schaffer (CCK+, calbindine+, somatostatine-, NPY-),

certains interneurons de la couche *lacunosum moleculare* et certains interneurons spécifiques aux interneurons.

Dans cette liste d'interneurons potentiellement impliqués dans la dépression hétérosynaptique, certains jouent un rôle dans l'inhibition rétroactive (Maccaferri et al., 2000) (les interneurons bistratifiés PV+, somatostatine+, NPY+, GABA_A+, CCK-) ou dans l'inhibition proactive (Lacaille et Schwartzkroin, 1988b) (certains interneurons de la couche *lacunosum moleculare*). En s'associant avec ces interneurons, les astrocytes participent directement à la modulation de l'activation des cibles des collatérales de Schaffer comme les cellules pyramidales de la région CA1 et donc au transfert d'information dans l'hippocampe.

6.6 LES ASTROCYTES COMME SOURCE D'ATP/ADÉNOSINE : LE DOUBLE RÔLE DE L'ATP DANS LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE

L'activation des récepteurs A₁ à l'adénosine est nécessaire à la dépression hétérosynaptique (Manzoni et al., 1994; Serrano et al., 2006). Nos résultats suggèrent que la libération d'ATP par les astrocytes, puis sa dégradation par des enzymes extracellulaires, produisent l'adénosine requise pour induire la dépression hétérosynaptique. De plus, l'équipe de Haydon a montré que les astrocytes libèrent l'ATP par un mécanisme vésiculaire (Pascual et al., 2005).

Dans le contexte de la dépression hétérosynaptique, l'ATP pourrait jouer un rôle double : premièrement comme source locale d'adénosine, le transmetteur inhibiteur qui induit la dépression hétérosynaptique; deuxièmement, comme messenger extracellulaire étendu qui induit le couplage entre astrocytes et facilite possiblement la propagation de la communication entre les astrocytes (Cotrina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Fam et al., 2000; Scemes et al., 2000; Wang et al., 2000; Newman, 2001). En augmentant le couplage entre astrocytes, l'ATP pourrait aussi augmenter l'étendue de la dépression hétérosynaptique.

6.7 CONTRIBUTION PARALLÈLE DES ASTROCYTES À LA PLT ET À LA DÉPRESSION HÉTÉRO-SYNAPTIQUE

6.7.1 EST-CE QU'UN MÊME ASTROCYTE PEUT CONTRIBUER À LA PLT ET À LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

Nos travaux suggèrent que les astrocytes, en libérant de l'ATP/adénosine, induisent la dépression hétérosynaptique dans l'hippocampe. Il a été démontré que les astrocytes, en libérant la D-sérine, font aussi une contribution essentielle à l'activation des récepteurs NMDA et à l'induction de la PLT (Nishiyama et al., 2002; Yang et al., 2003; Panatier et al., 2006). Il est possible de considérer que la dépression hétérosynaptique glutamatergique observée par l'équipe de Haydon soit produite par les mêmes astrocytes qui contribuent à la PLT. Par contre, il est peu probable que les astrocytes éloignés qui participent à une dépression hétérosynaptique qui est majoritairement GABAergique contribuent aussi à la PLT étant donné la distance entre ces astrocytes et les synapses potentialisées. Ceci suggère donc la présence d'astrocytes près du centre potentialisé qui contribuent localement à la fois à la dépression hétérosynaptique via l'ATP/adénosine et à la PLT via la D-sérine et la présence d'astrocytes éloignés qui contribuent majoritairement à la dépression hétérosynaptique GABAergique via l'ATP/adénosine. Finalement, le fait que les astrocytes aient la capacité de libérer simultanément la D-sérine et l'ATP semble être la condition essentielle à leur contribution parallèle à la PLT et à la dépression hétérosynaptique. La section suivante évalue cette possibilité.

6.7.2 EST-CE QU'UN MÊME ASTROCYTE PEUT LIBÉRER PLUSIEURS GLIOTRANSMETTEURS ?

Plusieurs études ont montré que l'élévation calcique dans les astrocytes induit la libération de différents gliotransmetteurs : de l'ATP (Wang et al., 2000; Newman, 2003), des cytokines proinflammatoires (Bezzi et al., 2001), de composés vasoactifs (Zonta et al., 2003), de la D-sérine (Mothet et al., 2005) et du glutamate (Papura et al., 1994). Cependant, il est inconnu si ces gliotransmetteurs sont co-libérés par

le ou les mêmes astrocytes de l'hippocampe ou si différents gliotransmetteurs sont libérés dans des conditions différentes (différents niveaux d'activation ou différentes modalités d'activation). Nous savons que la D-sérine (Mothet et al., 2005), le glutamate (Araque et al., 2000) et l'ATP (Pascual et al., 2005) sont libérés de façon vésiculaire par les astrocytes. Cependant, il est inconnu si ces gliotransmetteurs sont contenus dans les mêmes vésicules ou dans des vésicules différentes et si différentes vésicules peuvent avoir une sensibilité au calcium particulière. Finalement, il est aussi inconnu si différents gliotransmetteurs peuvent être libérés par une même cellule à partir de compartiments cellulaires distincts qui contactent différentes synapses. En considérant le nombre élevé de synapses contactées par un astrocyte (voir section 6.4.4) il devient vite évident que la régulation synaptique par la libération de gliotransmetteurs peut être extrêmement complexe.

6.8 RÔLE DES ASTROCYTES DANS LES MÉCANISMES D'APPRENTISSAGE ET DE MÉMOIRE

Nous avons vu dans l'introduction (section 2.4.1.1) que les parallèles entre les propriétés de la PLT et celles de la mémoire (associativité, durabilité, importance de l'hippocampe, activation des récepteurs NMDA, etc.) suggèrent que la PLT peut être le mécanisme de rétention d'information à la base de la mémoire (Bliss et Collingridge, 1993; Lynch, 2004). En tant que phénomène parallèle à la PLT dans l'hippocampe, la dépression hétérosynaptique possède aussi des propriétés qui peuvent être reliées aux caractéristiques de la mémoire. La prévention de la saturation synaptique maintient possible le stockage de mémoire dans l'efficacité synaptique (Dunwiddie et Lynch, 1978). Aussi, la réduction du bruit synaptique augmente le contraste entre l'efficacité des synapses potentialisées et les autres (Dunwiddie et Lynch, 1978). Finalement, en augmentant le seuil d'induction de la PLT, la dépression hétérosynaptique modifie le transfert d'information dans l'hippocampe (Dunwiddie et Lynch, 1978).

En démontrant un rôle clé des astrocytes dans la dépression hétérosynaptique, nos travaux suggèrent indirectement un lien entre ceux-ci et la mémoire. Plusieurs caractéristiques lient les fonctions astrocytaires à la PLT et de façon indirecte aux mécanismes de la mémoire. Tout d'abord, les prolongements astrocytaires qui contactent la synapse limitent la diffusion des neurotransmetteurs, diminuent la communication croisée et contribuent à la spécificité synaptique dans le transfert d'information (Oliet et al., 2001; Huang et Bergles, 2004), des caractéristiques qui contribuent de façon importante à la spécificité synaptique dans la PLT et la mémoire (Bliss et Collingridge, 1993). Tout comme la PLT, la modulation de l'efficacité synaptique par les astrocytes peut être durable (Abraham et al., 1995; Perea et Araque, 2007), une condition essentielle pour expliquer la persistance de la mémoire (Bliss et Collingridge, 1993). De plus, la modulation de l'efficacité synaptique par les astrocytes est présente dans l'hippocampe (Todd et al., 2006), une région où a lieu la PLT et qui est importante pour la formation de la mémoire (Lynch, 2004). Les astrocytes contribuent à l'activation des récepteurs NMDA par la libération de D-sérine (Schell et al., 1995; Panatier et al., 2006) et de glutamate (Pasti et al., 1997; Araque et al., 1998a; Bezzi et al., 1998; Parri et al., 2001). L'activation des récepteurs NMDA est une condition essentielle à l'induction de la PLT et de la mémoire (Morris et al., 1986; Lynch, 2004). Nous avons montré que les récepteurs NMDA peuvent contribuer à l'activation des astrocytes. Finalement, la dépression hétérosynaptique induite par les astrocytes fonctionnerait comme un filtre "passe-haut" où uniquement les activités afférentes importantes seraient transmises aux neurones postsynaptiques. Ce filtre permettrait d'isoler les voies pertinentes pour la mémoire aux synapses activées.

6.9 PERSPECTIVES

Plusieurs perspectives de recherche intéressantes peuvent être entreprises afin d'approfondir les connaissances sur la contribution des astrocytes dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe.

6.9.1 L'ACTIVATION CALCIQUE DES ASTROCYTES EST-ELLE SUFFISANTE POUR INDUIRE LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

Après avoir démontré que les astrocytes de type GluT sont nécessaires à l'induction de la dépression hétérosynaptique il serait important de vérifier si leur activation est suffisante pour induire ce type de plasticité. Il a été montré que les astrocytes de l'hippocampe peuvent être activés de façon directe et indépendante par une élévation calcique produite par photolyse de calcium encagé (Araque et al., 1998a; Perea et Araque, 2007). De plus, cette activation directe par photolyse est suffisante pour reproduire des mécanismes de plasticité synaptique (Araque et al., 1998a; Perea et Araque, 2007). Nous suggérons donc que la photolyse de calcium pourrait être utilisée pour confirmer que l'activation des astrocytes de l'hippocampe est suffisante pour induire la dépression hétérosynaptique. Des données préliminaires obtenues au laboratoire par Carola Schipke et Aude Panatier montrent d'ailleurs que l'activation des astrocytes par photolyse de calcium encagé est suffisante pour induire une dépression synaptique. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer s'il s'agit du même phénomène qui a lieu pendant la dépression hétérosynaptique.

6.9.2 QU'ELLE EST LA CONTRIBUTION DES DIFFÉRENTS TYPES D'ASTROCYTES À LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ?

Dans un deuxième temps, nous suggérons que la photolyse de calcium pourrait aussi être utilisée pour activer différents types d'astrocytes. Différents types d'astrocytes ont été caractérisés dans l'hippocampe mais leur contribution respective à la plasticité synaptique demeure inconnue (D'Ambrosio et al., 1998; Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004; Zhou et al., 2006). En stimulant indépendamment les astrocytes de type GluT et GluR il sera possible d'identifier leur rôle particulier dans la plasticité synaptique. Une hypothèse voudrait que les astrocytes GluR contribuent uniquement à des interactions locales dont la portée est observable aux synapses à proximité de la cellule stimulée. Par contre, l'activation d'un astrocyte GluT pourrait peut être induire des effets plus étendus.

6.9.3 QU'ELLE EST LA CONTRIBUTION DU SYNCYTIUM À DIFFÉRENTES FORMES DE PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ?

En considérant l'importance du réseau astrocytaire dans la dépression hétérosynaptique, il serait intéressant de vérifier la contribution du réseau astrocytaire à différentes formes de plasticité synaptique. La connectivité par des jonctions communicantes ("GAP") est une particularité des astrocytes mais la manipulation pharmacologique du syncytium glial n'est pas aisée dû à l'absence de molécules actives spécifiques (Naus et al., 1997; Scemes et al., 1998; Dermietzel et al., 2000; Rouach et al., 2000). Nous suggérons donc l'utilisation de souris transgéniques, qui n'expriment pas les connexines typiquement astrocytaires (Cx43 et Cx30), afin d'évaluer si une diminution de la connectivité astrocytaire a des conséquences sur différentes formes de plasticité synaptique. Par exemple, on pourrait s'attendre à ce que des formes de plasticité monosynaptiques locales soient indépendantes du réseau astrocytaire mais que des mécanismes plus étendus requièrent le syncytium glial.

6.9.4 QU'ELLE EST LA RELATION ENTRE LA PLT ET LA DÉPRESSION HÉTÉROSYNAPTIQUE ?

La dépression hétérosynaptique est un phénomène associé à la PLT dans l'hippocampe (Dunwiddie et Lynch, 1978). Par contre, aucune étude n'a examiné la relation spatiale entre les deux phénomènes. Afin de répondre à cette question, nous suggérons l'utilisation d'une chambre d'enregistrement à multi-électrodes (*multiarray recording chamber*) qui permet l'enregistrement simultané d'une matrice d'électrodes dispersée dans l'hippocampe (Stoppini et al., 1997). En enregistrant la transmission synaptique à plusieurs endroits en parallèle, il sera possible d'évaluer l'étendue de la dépression hétérosynaptique en relation avec la PLT. De plus, il serait possible d'examiner le rôle du syncytium glial dans l'étendue spatiale de la dépression hétérosynaptique. Il faut cependant considérer la possibilité que l'étendue de la dépression hétérosynaptique pourrait être inférieure à la résolution spatiale de cette technique.

6.9.5 VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS NMDA PAR LES ASTROCYTES DE L'HIPPOCAMPE

L'étude de différents types d'astrocytes dans l'hippocampe a démontré qu'ils expriment des récepteurs membranaires distincts (Seifert et Steinhauser, 1995; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et al., 2003). Par contre, la présence de récepteurs NMDA fonctionnels dans les astrocytes de l'hippocampe demeure controversée (Verkhratsky et Kirchhoff, 2007). La technique d'amplification de l'ARN par PCR permet d'amplifier le contenu cellulaire provenant de cellules enregistrées par patch clamp en configuration cellule entière et confirmer l'expression d'un récepteur (Schipke et al., 2001). En appliquant la PCR au contenu provenant de différents types astrocytaires de l'hippocampe, il serait donc possible d'y évaluer la présence de l'ARN de récepteurs NMDA (Schipke et al., 2001). La composition en différentes sous unités des récepteurs NMDA astrocytaires pourrait aussi être évaluée avec cette technique (Schipke et al., 2001). Il faut cependant considérer que des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier si ces protéines sont fonctionnelles.

7 CONCLUSION

La transmission de l'information dans le cerveau n'est pas un phénomène binaire "tout ou rien". Une propriété fondamentale est que l'efficacité de la transmission synaptique varie. Cette modification, ou plasticité synaptique, est considérée comme le mécanisme à la base des phénomènes d'apprentissage et de la mémoire. Des données récentes montrent que les astrocytes sont aussi des acteurs importants dans les mécanismes de plasticité monosynaptique. Grâce aux travaux de cette thèse, une preuve supplémentaire du rôle important des astrocytes dans la plasticité synaptique a été révélée. En effet, dans l'hippocampe, les astrocytes jouent un rôle essentiel dans l'induction de la dépression hétérosynaptique, un mécanisme dépendant de l'activation des récepteurs NMDA. Il semble que ce sont les astrocytes de type GluT qui sont impliqués dans ce phénomène. De plus, alors que l'activation des récepteurs NMDA dans l'hippocampe était associée à des processus exclusivement neuronaux, cette thèse apporte la preuve que les récepteurs NMDA sont également impliqués dans l'activation des astrocytes par des mécanismes différentiels en fonction du type cellulaire (astrocyte de type GluT ou GluR). En conclusion, cette thèse montre qu'une vision globale du fonctionnement synaptique reconnaît le rôle fondamental des astrocytes comme éléments actifs nécessaires à la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice ainsi qu'à l'entreposage de l'information dans le cerveau.

8 RÉFÉRENCES

- Abraham WC, Wickens JR (1991) Heterosynaptic long-term depression is facilitated by blockade of inhibition in area CA1 of the hippocampus. *Brain Res* 546:336-340.
- Abraham WC, Mason-Parker SE, Williams J, Dragunow M (1995) Analysis of the decremental nature of LTP in the dentate gyrus. *Brain Res Mol Brain Res* 30:367-372.
- Acsady L, Arabadzisz D, Freund TF (1996a) Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 73:299-315.
- Acsady L, Gorcs TJ, Freund TF (1996b) Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73:317-334.
- Ahmed Z, Lewis CA, Faber DS (1990) Glutamate stimulates release of Ca²⁺ from internal stores in astroglia. *Brain Res* 516:165-169.
- Akopian G, Kressin K, Derouiche A, Steinhäuser C (1996) Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca²⁺ currents. *Glia* 17:181-194.
- Alger BE, Teyler TJ (1976) Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res* 110:463-480.
- Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7041-7045.
- Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ (2000) Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 20:4091-4098.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51-86.
- Amaral DG, Insausti R, Cowan WM (1984) The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol* 224:307-336.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Amaral DG, Dolorfo C, Alvarez-Royo P (1991) Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* 1:415-435.
- Andersen P, Bliss TV, Lømo T, Olsen LI, Skrede KK (1969) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand* 76:4A-5A.

- Andersen P (1990) Synaptic integration in hippocampal CA1 pyramids. *Prog Brain Res* 83:215-222.
- Andersen P (2007) *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998a) 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, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998b) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666-673.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Barres BA, Chun LL, Corey DP (1988) Ion channel expression by white matter glia: I. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 1:10-30.
- Barres BA, Chun LL, Corey DP (1989) Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J Neurosci* 9:3169-3175.
- Bashir ZI, Collingridge GL (1992) NMDA Receptor-dependent Transient Homosynaptic and Heterosynaptic Depression in PicROTOXIN-treated Hippocampal Slices. *Eur J Neurosci* 4:485-490.
- Bear MF, Abraham WC (1996) Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci* 19:437-462.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295:2282-2285.
- Benarroch EE (2007) GABAA receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology* 68:612-614.
- Bennett MR (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol* 60:109-137.
- Bergles DE, Jahr CE (1997) Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19:1297-1308.
- Bergles DE, Jahr CE (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7709-7716.
- Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325.

- Bertrand S, Lacaille JC (2001) Unitary synaptic currents between lacunosum-moleculare interneurons and pyramidal cells in rat hippocampus. *J Physiol* 532:369-384.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 84:835-867.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Bezzi P, Domercq M, Vesce S, Volterra A (2001) Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Prog Brain Res* 132:255-265.
- Bhave G, Karim F, Carlton SM, Gereau RWt (2001) Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat Neurosci* 4:417-423.
- Binmoller FJ, Muller CM (1992) Postnatal development of dye-coupling among astrocytes in rat visual cortex. *Glia* 6:127-137.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jeune B (1970) Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 138:433-449.
- Bland BH (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol* 26:1-54.
- Blasco-Ibanez JM, Freund TF (1995) Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feedback activation. *Eur J Neurosci* 7:2170-2180.
- Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Blomstrand F, Aberg ND, Eriksson PS, Hansson E, Ronnback L (1999) Extent of intercellular calcium wave propagation is related to gap junction permeability and level of connexin-43 expression in astrocytes in primary cultures from four brain regions. *Neuroscience* 92:255-265.
- Blomstrand F, Venance L, Siren AL, Ezan P, Hanse E, Glowinski J, Ehrenreich H, Giaume C (2004) Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 19:1005-1015.
- Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ (1992) Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 258:292-295.
- Bokor H, Csaki A, Kocsis K, Kiss J (2002) Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur J Neurosci* 16:1227-1239.

- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671-675.
- Bordey A, Sontheimer H (1997) Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J Neurophysiol* 78:461-477.
- Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16-19.
- Brugger F, Wicki U, Nassenstein-Elton D, Fagg GE, Olpe HR, Pozza MF (1990) Modulation of the NMDA receptor by D-serine in the cortex and the spinal cord, in vitro. *Eur J Pharmacol* 191:29-38.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823-828.
- Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 256:1566-1570.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
- Butt AM, Colquhoun K, Tutton M, Berry M (1994) Three-dimensional morphology of astrocytes and oligodendrocytes in the intact mouse optic nerve. *J Neurocytol* 23:469-485.
- Buzsaki G, Eidelberg E (1982) Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 48:597-607.
- Buzsaki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340.
- Caballero-Bleda M, Witter MP (1993) Regional and laminar organization of projections from the presubiculum and parasubiculum to the entorhinal cortex: an anterograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 328:115-129.
- Caballero-Bleda M, Witter MP (1994) Projections from the presubiculum and the parasubiculum to morphologically characterized entorhinal-hippocampal projection neurons in the rat. *Exp Brain Res* 101:93-108.
- Cahill L, Haier RJ, Fallon J, Alkire MT, Tang C, Keator D, Wu J, McGaugh JL (1996) Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8016-8021.
- Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I, Kandel ER (1970) Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167:1745-1748.
- Castellucci V, Kandel ER (1976) Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science* 194:1176-1178.
- Castellucci VF, Carew TJ, Kandel ER (1978) Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science* 202:1306-1308.

- Chao TI, Rickmann M, Wolff JR (2002) The synapse-astrocyte boundary: anatomical basis for an integrative role of glia in synaptic transmission. In: Volterra, A., Magistretti, P., and Haydon, P. G., eds. *The tripartite synapse: Glia in synaptic transmission*. Oxford University Press, New York, pp. 3-23.
- Charles A (1998) Intercellular calcium waves in glia. *Glia* 24:39-49.
- Charles AC, Dirksen ER, Merrill JE, Sanderson MJ (1993) Mechanisms of intercellular calcium signaling in glial cells studied with dantrolene and thapsigargin. *Glia* 7:134-145.
- Charles AC, Giaume C (2002) Intercellular calcium waves in astrocytes underlying mechanisms and functional significance. In: Volterra, A., Haydon P.G., Magistretti P. (Eds.), *The Tripartite Synapse. Glia in synaptic transmission*. Oxford University Press, Oxford:110-126.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Chrobak JJ, Buzsaki G (1998) Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci* 18:388-398.
- Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Haganir RL (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24:10248-10259.
- Cipolotti L, Bird CM (2006) Amnesia and the hippocampus. *Curr Opin Neurol* 19:593-598.
- Clements JD, Westbrook GL (1991) Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7:605-613.
- Codazzi F, Teruel MN, Meyer T (2001) Control of astrocyte Ca²⁺ oscillations and waves by oscillating translocation and activation of protein kinase C. *Curr Biol* 11:1089-1097.
- 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* 334:33-46.
- Corkin S (1968) Acquisition of motor skill after bilateral medial temporal-lobe excision. *Neuropsychologia* 6:10.
- Corkin S, Amaral DG, Gonzalez RG, Johnson KA, Hyman BT (1997) H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 17:3964-3979.
- 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) Ca²⁺ waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12:185-204.
- Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, Bernard C, Ben-Ari Y (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1:470-478.

- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15735-15740.
- Couve A, Moss SJ, Pangalos MN (2000) GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* 16:296-312.
- Cuadros MA, Moujahid A, Martin-Partido G, Navascues J (1992) Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 148:11-14.
- D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, McKhann GM, 2nd, Janigro D (1998) Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 18:4425-4438.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.
- Delaney SM, Geiger JD (1996) Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation. *J Neurosci Methods* 64:151-156.
- Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.
- Dermietzel R, Spray DC (1998) From neuro-glue ('Nervenkitt') to glia: a prologue. *Glia* 24:1-7.
- Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC (2000) Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32:45-56.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dolleman-Van der Weel MJ, Witter MP (2000) Nucleus reuniens thalami innervates gamma aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neurosci Lett* 278:145-148.
- Dolorfo CL, Amaral DG (1998a) Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol* 398:25-48.
- Dolorfo CL, Amaral DG (1998b) Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 398:49-82.
- Donevan SD, Rogawski MA (1995) Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca(2+)-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9298-9302.
- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4363-4367.
- Duffy S, MacVicar BA (1994) Potassium-dependent calcium influx in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Neuroscience* 61:51-61.

- Dunwiddie T, Lynch G (1978) Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J Physiol* 276:353-367.
- Dunwiddie TV, Hoffer BJ (1980) Adenine nucleotides and synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 69:59-68.
- Dunwiddie TV, Diao L, Kim HO, Jiang JL, Jacobson KA (1997) Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci* 17:607-614.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Eldridge LL, Knowlton BJ, Furmanski CS, Bookheimer SY, Engel SA (2000) Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nat Neurosci* 3:1149-1152.
- Enkvist MO, McCarthy KD (1992) Activation of protein kinase C blocks astroglial gap junction communication and inhibits the spread of calcium waves. *J Neurochem* 59:519-526.
- Enz R, Cutting GR (1998) Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* 38:1431-1441.
- Fam SR, Gallagher CJ, Salter MW (2000) P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. *J Neurosci* 20:2800-2808.
- Fanselow MS, Poulos AM (2005) The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol* 56:207-234.
- Fatatis A, Russell JT (1992) Spontaneous changes in intracellular calcium concentration in type I astrocytes from rat cerebral cortex in primary culture. *Glia* 5:95-104.
- Faulkner HJ, Traub RD, Whittington MA (1998) Disruption of synchronous gamma oscillations in the rat hippocampal slice: a common mechanism of anaesthetic drug action. *Br J Pharmacol* 125:483-492.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722-732.
- Finkbeiner S (1992) Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps. *Neuron* 8:1101-1108.
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA (1995) GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15:2720-2732.
- Fredholm BB, Dunwiddie TV (1988) How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* 9:130-134.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.

- Freund TF (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26:489-495.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260:1661-1664.
- Frey U, Morris RG (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533-536.
- Fritschy JM, Brunig I (2003) Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* 98:299-323.
- Gaarskjaer FB (1978a) Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J Comp Neurol* 178:49-72.
- Gaarskjaer FB (1978b) Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 178:73-88.
- Gahwiler BH, Brown DA (1985) GABAB-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1558-1562.
- Gallagher CJ, Salter MW (2003) Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J Neurosci* 23:6728-6739.
- Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247.
- Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D (1991) Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-143.
- Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19:319-325.
- Giaume C, Venance L (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24:50-64.
- Gilbert JA, Parekh AB (2000) Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca²⁺ current I(CRAC). *Embo J* 19:6401-6407.
- Glaum SR, Holzwarth JA, Miller RJ (1990) Glutamate receptors activate Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ influx into astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3454-3458.
- Goldberg JH, Yuste R, Tamas G (2003) Ca²⁺ imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: contribution of Ca²⁺-permeable AMPA and NMDA receptors to subthreshold Ca²⁺dynamics. *J Physiol* 551:67-78.
- Gomes P, Srinivas SP, Van Driessche W, Vereecke J, Himpens B (2005) ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1208-1218.
- Greenstein YJ, Pavlides C, Winson J (1988) Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. *Brain Res* 438:331-334.

- Grosche J, Matyash V, Moller 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.
- Guan X, Cravatt BF, Ehring GR, Hall JE, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1997) The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells. *J Cell Biol* 139:1785-1792.
- Gulyas AI, Megias M, Emri Z, Freund TF (1999) Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci* 19:10082-10097.
- Gulyas AI, Hajos N, Katona I, Freund TF (2003) Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci* 17:1861-1872.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007a) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27:6473-6477.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007b) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54-63.
- Hammond C (2001) Cellular and molecular neurobiology, 2nd Edition. San Diego, Calif. London: Academic.
- Harris KM, Marshall PE, Landis DM (1985) Ultrastructural study of cholecystinin-immunoreactive cells and processes in area CA1 of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 233:147-158.
- Harris KM, Landis DM (1986) Membrane structure at synaptic junctions in area CA1 of the rat hippocampus. *Neuroscience* 19:857-872.
- Harris KM, Sultan P (1995) Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology* 34:1387-1395.
- 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.
- Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB (1996) An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13268-13273.
- Hatten ME (1985) Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol* 100:384-396.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.

- Hebb DO (1949) *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. New York: Wiley.
- Hebb DO (2002) *The organization of behavior : a neuropsychological theory*. Mahwah, N.J.: L. Erlbaum Associates.
- Henson RN, Rugg MD, Shallice T, Josephs O, Dolan RJ (1999) Recollection and familiarity in recognition memory: an event-related functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci* 19:3962-3972.
- Henson RN (2003) Neuroimaging studies of priming. *Prog Neurobiol* 70:53-81.
- 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, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57:417-428.
- Hessler NA, Shirke AM, Malinow R (1993) The probability of transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 366:569-572.
- Hill DR (1985) GABAB receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. *Br J Pharmacol* 84:249-257.
- Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*, 3rd Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Holscher C (1997) Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 20:298-303.
- 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.
- Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14:346-352.
- Iacobas DA, Suadicani SO, Spray DC, Scemes E (2006) A stochastic two-dimensional model of intercellular Ca²⁺ wave spread in glia. *Biophys J* 90:24-41.
- Innocenti B, Parpura V, Haydon PG (2000) Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci* 20:1800-1808.
- Inoue K, Nakazawa K, Fujimori K, Watano T, Takanaka A (1992) Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 134:215-218.
- Inoue K (1998a) ATP receptors for the protection of hippocampal functions. *Jpn J Pharmacol* 78:405-410.
- Inoue K (1998b) The functions of ATP receptors in the hippocampus. *Pharmacol Res* 38:323-331.
- Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-434.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295:580-623.

- Jabs R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Steinhauser C (1994) Kainate activates Ca²⁺-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K⁺ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflugers Arch* 426:310-319.
- Jaffe LF (1993) Classes and mechanisms of calcium waves. *Cell Calcium* 14:736-745.
- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631-643.
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Jonas P, Bischofberger J, Fricker D, Miles R (2004) Interneuron Diversity series: Fast in, fast out--temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends Neurosci* 27:30-40.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396:674-679.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of neural science, 4th Edition. New York ; Montréal: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
- Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA (1988) NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 334:250-252.
- 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.
- Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249:556-560.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Kettenmann H, Ransom BR (2005) Neuroglia, 2nd Edition. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Kirchhoff F, Kettenmann H (1992) GABA Triggers a [Ca²⁺]_i Increase in Murine Precursor Cells of the Oligodendrocyte Lineage. *Eur J Neurosci* 4:1049-1058.
- Kirov SA, Sorra KE, Harris KM (1999) Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats. *J Neurosci* 19:2876-2886.
- Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837.

- Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11023-11028.
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39-42.
- Kubera C, Pascual O, Haydon PG (2007) Astrocyte-derived adenosine mediates synaptic cross-talk in the murine hippocampal network. *Gordon Research Conference Neuron-Glia biology*.
- Kukley M, Barden JA, Steinhäuser C, Jabs R (2001) Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36:11-21.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
- Lacaille JC, 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.
- Lacaille JC, Schwartzkroin PA (1988a) Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. *J Neurosci* 8:1400-1410.
- Lacaille JC, Schwartzkroin PA (1988b) Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intrasomatic and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *J Neurosci* 8:1411-1424.
- Lacaille JC, Williams S (1990) Membrane properties of interneurons in stratum oriens-alveus of the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *Neuroscience* 36:349-359.
- Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC (2001) Differential mechanisms of Ca²⁺ responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* 11:132-145.
- Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.
- Laurie DJ, Putzke J, Zieglgansberger W, Seeburg PH, Tolle TR (1995) The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 32:94-108.
- Lawrence JJ, McBain CJ (2003) Interneuron diversity series: containing the detonation--feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. *Trends Neurosci* 26:631-640.
- Lee JC, Greig A, Ravindranathan A, Parks TN, Rao MS (1998) Molecular analysis of AMPA-specific receptors: subunit composition, editing, and calcium influx determination in small amounts of tissue. *Brain Res Brain Res Protoc* 3:142-154.

- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18:8751-8757.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsaki G (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339:181-208.
- Liu G, Choi S, Tsien RW (1999) Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron* 22:395-409.
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA (1995) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11175-11179.
- Logan WJ, Snyder SH (1971) Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in central nervous tissue of the rat. *Nature* 234:297-299.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH (1990) Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 70:453-511.
- Lorente de Nó R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46:64.
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305:719-721.
- Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266:737-739.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- Ma L, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA (1999) Cyclic AMP induces functional presynaptic boutons in hippocampal CA3-CA1 neuronal cultures. *Nat Neurosci* 2:24-30.
- Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P (2000) Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 524 Pt 1:91-116.
- Maccaferri G, Lacaille JC (2003) Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci* 26:564-571.
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321:519-522.
- MacVicar BA (1984) Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.

- MacVicar BA, Tse FW (1988) Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured rat astrocytes. *Glia* 1:359-365.
- Maguire EA, Frith CD (2003) Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. *J Neurosci* 23:5302-5307.
- Maienschein V, Marxen M, Volkhardt W, Zimmermann H (1999) A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* 26:233-244.
- Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, Nicoll RA (1988) Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242:81-84.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA (1994) Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265:2098-2101.
- Martin ED, Fernandez M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Cena V (2007) Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55:36-45.
- Martineau M, Baux G, Mothet JP (2006) D-serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci* 29:481-491.
- Matsutani S, Yamamoto N (1997) Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling. *Glia* 20:1-9.
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhauser C (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 23:1750-1758.
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- Mayer ML, Armstrong N (2004) Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 66:161-181.
- McBain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA (1994) Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 14:4433-4445.
- McBain CJ, Freund TF, Mody I (1999) Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. *Trends Neurosci* 22:228-235.
- McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11-23.
- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex:

- insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 102:419-457.
- McKhann GM, 2nd, 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.
- Mennerick S, Benz A, Zorumski CF (1996) Components of glial responses to exogenous and synaptic glutamate in rat hippocampal microcultures. *J Neurosci* 16:55-64.
- Miller G (2005) How are memories stored and retrieved? *Science* 309:92.
- Miller RH, Liuzzi FJ (1986) Regional specialization of the radial glial cells of the adult frog spinal cord. *J Neurocytol* 15:187-196.
- Milner B, Penfield W (1955) The effect of hippocampal lesions on recent memory. *Trans Am Neurol Assoc*:42-48.
- Milner B (1965) Visually guided maze learning in man: effects of bilateral hippocampal, bilateral frontal, and unilateral cerebral lesions. *Neuropsychologia* 3:21.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Milner B (2005) The medial temporal-lobe amnesic syndrome. *Psychiatr Clin North Am* 28:599-611, 609.
- Mintz IM, Bean BP (1993) GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 10:889-898.
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1997) The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev* 23:145-195.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE (1990) Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur J Neurosci* 2:1016-1028.
- Moser E, Moser MB, Andersen P (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13:3916-3925.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9697-9701.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5606-5611.
- Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-975.

- 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.
- Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
- Murphy DD, Segal M (1997) Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1482-1487.
- Naber PA, Witter MP, Lopes Silva FH (2000) Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum. *Ann N Y Acad Sci* 911:392-403.
- Naber PA, Lopes da Silva FH, Witter MP (2001) Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus* 11:99-104.
- Nadarajah B, Thomaidou D, Evans WH, Parnavelas JG (1996) Gap junctions in the adult cerebral cortex: regional differences in their distribution and cellular expression of connexins. *J Comp Neurol* 376:326-342.
- Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M (2000) Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus* 10:352-368.
- Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL (1999) Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88:447-468.
- Nagy JI, Li X, Rempel J, Stelmack G, Patel D, Staines WA, Yasumura T, Rash JE (2001) Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp Neurol* 441:302-323.
- Naus CC, Bechberger JF, Zhang Y, Venance L, Yamasaki H, Juneja SC, Kidder GM, Giaume C (1997) Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin43. *J Neurosci Res* 49:528-540.
- Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA (1994) Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* 62:815-818.
- Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
- New DC, An H, Ip NY, Wong YH (2006) GABAB heterodimeric receptors promote Ca²⁺ influx via store-operated channels in rat cortical neurons and transfected Chinese hamster ovary cells. *Neuroscience* 137:1347-1358.
- Newman EA (2001) Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci* 21:2215-2223.
- Newman EA (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23:1659-1666.

- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
- Nilsson M, Eriksson PS, Ronnback L, Hansson E (1993) GABA induces Ca²⁺ transients in astrocytes. *Neuroscience* 54:605-614.
- Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4037-4042.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- Nunzi MG, Gorio A, Milan F, Freund TF, Somogyi P, Smith AD (1985) Cholecystokinin-immunoreactive cells form symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *J Comp Neurol* 237:485-505.
- Nurse S, Lacaille JC (1997) Do GABAA and GABAB inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can J Physiol Pharmacol* 75:520-525.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- Okada D, Yamagishi S, Sugiyama H (1989) Differential effects of phospholipase inhibitors in long-term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Schaffer/commissural synapses. *Neurosci Lett* 100:141-146.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923-926.
- Ouardouz M, Lacaille JC (1995) Mechanisms of selective long-term potentiation of excitatory synapses in stratum oriens/alveus interneurons of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 73:810-819.
- Packard MG, Hirsh R, White NM (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J Neurosci* 9:1465-1472.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452:589-597.
- Parker I, Yao Y (1991) Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc Biol Sci* 246:269-274.
- 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.
- Parpura V, Haydon PG (2000) Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8629-8634.

- Parra P, Gulyas AI, Miles R (1998) How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* 20:983-993.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4:803-812.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-116.
- 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.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21:477-484.
- Pawelzik H, Hughes DI, Thomson AM (2002) Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurons in CA1 of the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 443:346-367.
- Peakman MC, Hill SJ (1995) Adenosine A1 receptor-mediated changes in basal and histamine-stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol* 115:801-810.
- Peghini P, Janzen J, Stoffel W (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *Embo J* 16:3822-3832.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.
- Penfield W, Milner B (1958) Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 79:475-497.
- Penfield W, Mathieson G (1974) Memory. Autopsy findings and comments on the role of hippocampus in experiential recall. *Arch Neurol* 31:145-154.
- Perea G, Araque A (2005a) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38:375-382.
- Perea G, Araque A (2005b) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25:2192-2203.
- Perea G, Araque A (2005c) Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal. *J Neural Transm* 112:127-135.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Peters A, Josephson K, Vincent SL (1991) Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex. *Anat Rec* 229:384-398.

- Pfrieger FW, Barres BA (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277:1684-1687.
- Piet R, Vargova L, Sykova E, Poulain DA, Oliet SH (2004) Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2151-2155.
- Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen A (1999) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* 403:229-260.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Poldrack RA, Gabrieli JD (1997) Functional anatomy of long-term memory. *J Clin Neurophysiol* 14:294-310.
- Porter JT, McCarthy KD (1995a) Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes in situ. *J Neurochem* 65:1515-1523.
- Porter JT, McCarthy KD (1995b) GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia* 13:101-112.
- 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.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293:1159-1163.
- Radpour S, Thomson AM (1992) Synaptic enhancement induced by NMDA and Qp receptors and presynaptic activity. *Neurosci Lett* 138:119-122.
- Raisman G, Cowan WM, Powell TP (1966) An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. *Brain* 89:83-108.
- Ramón y Cajal S (1893) Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann Soc Esp Hist Nat* 22.
- Ramón y Cajal S, Fernández Santarén J (2006) Recuerdos de mi vida. Barcelona: Crítica.
- Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI (2001) Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci* 21:1983-2000.
- Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, Wolff JR, Noone D, Robinson SR (1995) Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch* 36:509-517.
- Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG (1996) Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci* 16:5233-5255.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14:835-857.
- Riedel G, Platt B, Micheau J (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1-47.

- Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5:773-779.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.
- Roediger HL, 3rd (1990) Implicit memory. Retention without remembering. *Am Psychol* 45:1043-1056.
- Rooney TA, Thomas AP (1993) Intracellular calcium waves generated by Ins(1,4,5)P₃-dependent mechanisms. *Cell Calcium* 14:674-690.
- Rosenberg PA, Aizenman E (1989) Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 103:162-168.
- Rosenberg PA, Amin S, Leitner M (1992) Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci* 12:56-61.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl 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.
- Rouach N, Glowinski J, Giaume C (2000) Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149:1513-1526.
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457-475.
- Ryan L, Nadel L, Keil K, Putnam K, Schnyer D, Trouard T, Moscovitch M (2001) Hippocampal complex and retrieval of recent and very remote autobiographical memories: evidence from functional magnetic resonance imaging in neurologically intact people. *Hippocampus* 11:707-714.
- Salt TE (1989) Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and D-serine in the rat thalamus in vivo. *Brain Res* 481:403-406.
- Sanderson MJ, Charles AC, Boitano S, Dirksen ER (1994) Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol* 98:173-187.
- Sanzgiri RP, Araque A, Haydon PG (1999) Prostaglandin E₂ stimulates glutamate receptor-dependent astrocyte neuromodulation in cultured hippocampal cells. *J Neurobiol* 41:221-229.
- Scemes E, Dermietzel R, Spray DC (1998) Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia* 24:65-73.
- Scemes E, Suadicani SO, Spray DC (2000) Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P₂ nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J Neurosci* 20:1435-1445.

- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-3952.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *Faseb J* 15:1270-1272.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H (2002) Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *Faseb J* 16:255-257.
- Scholz KP, Miller RJ (1991) GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 444:669-686.
- Schwartzkroin PA, Wester K (1975) Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. *Brain Res* 89:107-119.
- Schwartzkroin PA, Mathers LH (1978) Physiological and morphological identification of a nonpyramidal hippocampal cell type. *Brain Res* 157:1-10.
- Scoville WB (1954) The limbic lobe in man. *J Neurosurg* 11:64-66.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Seifert G, Steinhauser C (1995) Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur J Neurosci* 7:1872-1881.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R (2006) GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci* 26:5370-5382.
- Shelton MK, McCarthy KD (1999) Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 26:1-11.
- Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2:795-816.
- Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsaki G (1995) Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci* 15:6651-6665.
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Singer W (1999) Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron* 24:49-65, 111-125.
- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317:717-719.

- Sneyd J, Charles AC, Sanderson MJ (1994) A model for the propagation of intercellular calcium waves. *Am J Physiol* 266:C293-302.
- Sneyd J, Wetton BT, Charles AC, Sanderson MJ (1995) Intercellular calcium waves mediated by diffusion of inositol trisphosphate: a two-dimensional model. *Am J Physiol* 268:C1537-1545.
- Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, El Mestikawy S, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci* 19:552-569.
- Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD (1983) A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res* 259:137-142.
- Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9-26.
- Sosinsky GE, Nicholson BJ (2005) Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 1711:99-125.
- Squire LR (1987) The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* 21-22:218-222.
- Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380-1386.
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169-177.
- Squire LR, Bayley PJ (2007) The neuroscience of remote memory. *Curr Opin Neurobiol* 17:185-196.
- Steinhauser C, Berger T, Frotscher M, Kettenmann H (1992) Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci* 4:472-484.
- Steinhauser C, Jabs R, Kettenmann H (1994) Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 4:19-35.
- Stellwagen D, Malenka RC (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440:1054-1059.
- Steward O, Scoville SA (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 169:347-370.
- Stoppini L, Duport S, Correges P (1997) A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures. *J Neurosci Methods* 72:23-33.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277:10482-10488.

- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417:245-253.
- Tamamaki N, Nojyo Y (1993) Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* 3:471-480.
- Tan Y, Hori N, Carpenter DO (2003) The mechanism of presynaptic long-term depression mediated by group I metabotropic glutamate receptors. *Cell Mol Neurobiol* 23:187-203.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Taube JS, Schwartzkroin PA (1987) Intracellular recording from hippocampal CA1 interneurons before and after development of long-term potentiation. *Brain Res* 419:32-38.
- Theodosis DT, Poulain DA (1993) Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57:501-535.
- Thompson RF, Kim JJ (1996) Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13438-13444.
- Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL (1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364:70-73.
- Todd KJ, Serrano A, Lacaille JC, Robitaille R (2006) Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris* 99:75-83.
- Tong G, Jahr CE (1994) Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* 13:1195-1203.
- Toth K, Borhegyi Z, Freund TF (1993) Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci* 13:3712-3724.
- Trussell LO, Jackson MB (1985) Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4857-4861.
- Turecek R, Trussell LO (2000) Control of synaptic depression by glutamate transporters. *J Neurosci* 20:2054-2063.
- Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47:209-216.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C (1995) Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376:590-594.
- 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 KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.

- Verkhatsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 13:28-37.
- Vida I, Halasy K, Szinyei C, Somogyi P, Buhl EH (1998) Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 506 (Pt 3):755-773.
- Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG (2002) The tripartite synapse : glia in synaptic transmission. Oxford: Oxford University Press.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48:36-43.
- Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 26:5438-5447.
- 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.
- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291-300.
- Wang Z, Tymianski M, Jones OT, Nedergaard M (1997) Impact of cytoplasmic calcium buffering on the spatial and temporal characteristics of intercellular calcium signals in astrocytes. *J Neurosci* 17:7359-7371.
- Wang Z, Haydon PG, Yeung ES (2000) Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal Chem* 72:2001-2007.
- Watabe AM, Carlisle HJ, O'Dell TJ (2002) Postsynaptic induction and presynaptic expression of group 1 mGluR-dependent LTD in the hippocampal CA1 region. *J Neurophysiol* 87:1395-1403.
- Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10:976-988.
- Wenzel J, Lammert G, Meyer U, Krug M (1991) The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. *Brain Res* 560:122-131.
- Westenbroek RE, Bausch SB, Lin RC, Franck JE, Noebels JL, Catterall WA (1998) Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in reactive astrocytes after brain injury, hypomyelination, and ischemia. *J Neurosci* 18:2321-2334.

- Wickens JR, Abraham WC (1991) The involvement of L-type calcium channels in heterosynaptic long-term depression in the hippocampus. *Neurosci Lett* 130:128-132.
- Wieraszko A, Seyfried TN (1989) ATP-induced synaptic potentiation in hippocampal slices. *Brain Res* 491:356-359.
- Wigstrom H, Gustafsson B (1985) On long-lasting potentiation in the hippocampus: a proposed mechanism for its dependence on coincident pre- and postsynaptic activity. *Acta Physiol Scand* 123:519-522.
- Williams JH, Errington ML, Lynch MA, Bliss TV (1989) Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 341:739-742.
- Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201:160-163.
- Wisden W, Seeburg PH (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 3:291-298.
- Witter MP, Griffioen AW, Jorritsma-Byham B, Krijnen JL (1988) Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. *Neurosci Lett* 85:193-198.
- Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM (1980) The organization of the fimbria, dorsal fornix and ventral hippocampal commissure in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 158:303-316.
- Yamamoto T, Ochalski A, Hertzberg EL, Nagy JI (1990) On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression. *J Comp Neurol* 302:853-883.
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15194-15199.
- Yao Y, Choi J, Parker I (1995) Quantal puffs of intracellular Ca²⁺ evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 482 (Pt 3):533-553.
- Yasuda H, Barth AL, Stellwagen D, Malenka RC (2003) A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci* 6:15-16.
- Yerkes RM, Morgulis S (1909) The method of Pawlow in animal psychology. *The physiological bulletin* 6:17.
- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
- Zappone CA, Sloviter RS (2001) Commissurally projecting inhibitory interneurons of the rat hippocampal dentate gyrus: a colocalization study of neuronal markers and the retrograde tracer Fluoro-gold. *J Comp Neurol* 441:324-344.
- Zerangue N, Kavanaugh MP (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383:634-637.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971-982.

- Zhou M, Kimelberg HK (2001) Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J Neurosci* 21:7901-7908.
- Zhou M, Schools GP, Kimelberg HK (2006) Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. *J Neurophysiol* 95:134-143.
- Zhuo L, Sun B, Zhang CL, Fine A, Chiu SY, Messing A (1997) Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev Biol* 187:36-42.
- Zimmermann H, Braun N (1999) Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res* 120:371-385.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950-2967.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Rempel NL, Clower RP, Amaral DG (1992) Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *J Neurosci* 12:2582-2596.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Ramus SJ (1994) Severity of memory impairment in monkeys as a function of locus and extent of damage within the medial temporal lobe memory system. *Hippocampus* 4:483-495.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.

9 ANNEXE



Glial cells in synaptic plasticity

Keith J. Todd¹, Alexandre Serrano¹, Jean-Claude Lacaille, Richard Robitaille^{*}

Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal,
C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Que., Canada H3C 3J7

Abstract

Plasticity of synaptic transmission is believed to be the cellular basis for learning and memory, and depends upon different pre- and post-synaptic neuronal mechanisms. Recently, however, an increasing number of studies have implicated a third element in plasticity; the perisynaptic glial cell. Originally glial cells were thought to be important for metabolic maintenance and support of the nervous system. However, work in the past decade has clearly demonstrated active involvement of glia in stability and overall nervous system function as well as synaptic plasticity. Through specific modulation of glial cell function, a wide variety of roles for glia in synaptic plasticity have been uncovered. Furthermore, interesting circumstantial evidence suggests a glial involvement in multiple other types of plasticity. We will discuss recent advances in neuron–glial interactions that take place during synaptic plasticity and explore different plasticity phenomena in which glial cells may be involved.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Synaptic plasticity; Neuron glia interactions; Glial cells; Synapse; Transmitter release

1. Introduction

Although glial cells are important for structural and metabolic maintenance of the nervous system, there are now numerous reports demonstrating the ability of glia to respond to, and send signals to neurons and synapses in the central and peripheral nervous systems (CNS and PNS). Evidence further suggests that glial contributions to synaptic communication and plasticity are complex and heterogeneous. However, glial cells remain relatively understudied in comparison to their ‘spiking’ counterparts. Through the use of calcium imaging in glia, it has become easier to investigate interactions between glial cells and neurons. Here, we will discuss plasticity events from the perspective of the tripartite synapse (glia plus neuronal elements) and suggest roles for glia in synaptic plasticity.

Synaptic plasticity is defined as a change in efficacy of synapses that is mediated by various pre- and post-synaptic

mechanisms. However, we will present evidence that glia modulate or even mediate synaptic plasticity and propose areas of possible glial involvement in a wider range of neuronal phenomena. It is well established that glia can interact with neurons in a variety of ways with a variety of outcomes. However, is there one or several reoccurring theme(s) that can be obtained from what we know about specific neuron–glial interactions?

2. Synaptic plasticity

Efficacy of synaptic transmission is variable and changes with experience. This ability of synapses to modulate their efficacy, termed synaptic plasticity, encompasses a large number of cellular phenomena that modify synaptic function. A wide variety of changes can occur pre-synaptically to alter transmitter release properties and/or post-synaptically to modify the responsiveness to transmitter release such as receptor trafficking. These changes occur in a frequency-dependent manner and can result in increased efficacy, termed potentiation, or in a reduction of synaptic efficacy, termed depression. Additionally, these changes in synaptic efficacy can be accompanied and supported

^{*} Corresponding author. Tel.: +1 514 343 6111x1964; fax: +1 514 343 2111.

E-mail address: [REDACTED]

¹ These authors contributed equally to this work.

by morphological changes such as extrasynaptic density and synaptic coverage.

Different types of synaptic plasticity (short- and long-term) can be distinguished based on their temporal properties. The former lasts for seconds to minutes and transmitter release returns to control levels with no apparent long-term modification in synaptic efficacy. For the latter, changes in synaptic transmission last several minutes to hours, days and weeks. Synaptic plasticity phenomena can also be characterized according to the complexity of the synaptic pathways involved, with homosynaptic plasticity representing modifications confined to a single afferent pathway and heterosynaptic plasticity involving interactions between two or more distinct afferents.

The properties of plasticity have traditionally been attributed solely to neurons. However, recent evidence has come to the fore-front suggesting that not all plasticity events can be explained by neuronal elements and that glial cells provide an essential contribution.

3. Glia and synaptic plasticity

3.1. Glia, synaptogenesis and synaptic efficacy

Glial cells are known to be plastic structures, able to change their phenotypes under various conditions such as following injury or during development (Son and Thompson, 1995). Because of this plasticity, and their ability to release trophic factors and glio-transmitters, it has been proposed that glial cells may be important for synapse formation during development. Experimental data have been obtained in the past decade in support of such a role (Beattie et al., 2002; Mauch et al., 2001; Pfrieger and Barres, 1997; Ullian et al., 2001). Pfrieger and Barres (1997) demonstrated the importance of glial cells on synaptic development in retinal ganglion cell (RGC) cultures. An increase in frequency of excitatory post-synaptic currents (EPSCs) and a decrease in failure rate were observed when RGCs were cocultured with glial cells. In the same culture system, Ullian et al. (2001) demonstrated that an increased number of functional synapses are formed in the presence of glia. These effects were thought to be due to diffusible factors released by glial cells. The same group recently demonstrated similar results in motoneuron cultures, suggesting that this may be a conserved mechanism in CNS synaptogenesis (Ullian et al., 2004). Further experiments with RGC cultures demonstrated that cholesterol by itself was sufficient to induce the same changes as glial-conditioned media (Mauch et al., 2001). This supports the hypothesis that glia can be directly involved in synaptic efficacy through release of diffusible factors that alter the molecular and functional phenotype of neurons.

In a separate study, Beattie et al. (2002) demonstrated an important role for cytokines in synaptic strength. Initial experiments were performed on hippocampal cultures where they found that tumour necrosis factor- α (TNF α) increased AMPA receptor trafficking and surface expres-

sion. Interestingly, it was shown that TNF α was a factor released by glial cells. In culture, a decrease in EPSC frequency and amplitude was observed following the addition of a functional antagonist (soluble TNF receptor 1). These authors found similar results when using hippocampal slices, where EPSC frequency was also reduced.

Recently, exciting results from the work of Barres and colleagues demonstrated a role for glia and glial-released factors in synaptic function in vivo (Christopherson et al., 2005). A family of extracellular matrix proteins called thrombospondins were shown to be released from astrocytes in culture and to increase expression of pre- and post-synaptic proteins in RGC cultures. These authors went on to show that not only were thrombospondins widely expressed in astrocytes in developing brain, but that knockout mice had fewer synapses than controls. The temporally restricted expression of thrombospondins around the time of synaptogenesis is thought to be important for synapse formation in many brain regions. This may be a general mechanism by which glia can influence synaptogenesis in the CNS.

Similar results to those found in RGC cultures (Mauch et al., 2001) were found in *Xenopus* nerve-muscle coculture by Ko and co-workers (Peng et al., 2003). This group demonstrated that addition of Schwann-cell conditioned media (SCCM) to cultures could increase the number of nerve-muscle contact points that were apposed to nicotinic cholinergic receptor (AChR) clusters. It appears that SCCM is able to change neurites from an outgrowth mode to a more stable mode capable of undergoing synaptogenesis. The contents of the SCCM were not determined in these experiments. However, it would be interesting to see if the factors are similar to those found in other culture systems, such as cholesterol or cytokines. Although many of these results were obtained in culture, some were tested and reproduced in more intact preparations (Beattie et al., 2002; Christopherson et al., 2005). This would suggest the existence of a common role for glial cells in synapse formation and stabilisation.

Increasingly, results are coming to light that demonstrate a high level of morphological plasticity in CNS neurons (Dunaevsky et al., 1999; Fischer et al., 1998). Morphological changes can occur in a matter of seconds (Dunaevsky et al., 1999; Fischer et al., 1998) and are dependent on neuron-neuron contact and synaptic activity (Dunaevsky et al., 2001; Portera-Cailliau et al., 2003). However, other results have demonstrated a role for glia in balancing dendritic plasticity and stability. The membrane bound ephrin ligands bind to tyrosine kinase Eph receptors and regulate various cell-cell interactions. Murai et al. (2003) found that ephrin-A3 was expressed on astrocytic processes in the hippocampus. Expression of ephrin-A3 by glia serves to negatively regulate dendritic spine expansion. Therefore, when astrocytes do not surround a dendritic spine, they do not make the necessary contact to initiate Eph signaling, thereby allowing further elaboration of the spine. This work suggests an ability of glia to

directly regulate morphological plasticity in the intact brain.

The above-mentioned examples are indicative of the importance of glial cells in synaptic function, plasticity and development. Furthermore, not only are glia involved in the molecular modification of synaptic function, they can also induce morphological changes at the cellular level. This is a fascinating avenue of research since glial cells are known to have stabilizing roles at synapses (Balice-Gordon, 1996). This potentially indicates the capacity for glial cells to stabilize synapses under a certain set of conditions and to induce modification under another. However, the question remains; do such glial-mediated molecular and morphological synaptic modifications occur *in vivo* outside the context of synapse formation?

3.2. Glia, architectural plasticity and neurotransmitter clearance

The examples discussed above demonstrate the ability of glia to modify synapses. However, neuronal changes may not be the only aspect of glial-mediated synaptic plasticity. Recently it has been found that glial cells not only modify neuronal plasticity, but they are themselves also plastic and can change in response to neuronal activity (Oliet et al., 2001; Piet et al., 2004). Furthermore, these studies demonstrate that glial plasticity can occur in adult systems where changes in glial structure alter both the immediate synaptic environment as well as the surrounding extracellular space. These changes could have profound effects on synaptic function and plasticity.

Clear evidence was obtained in the supraoptic nucleus (SON). Indeed, this region of the brain undergoes dramatic architectural changes due to hormonal regulation during lactation in adult females (Theodosios and Poulain, 1993). Increased levels of neuronal activity, observed during lactation, result in decreased glial coverage of these glutamatergic synapses. The possibility that these changes could alter glutamate clearance and thus modulate synaptic efficacy was investigated (Oliet et al., 2001). At this synapse, pre-synaptic neurons release glutamate, activating post-synaptic AMPA receptors. However, the pre-synaptic neuron also expresses metabotropic glutamate receptors (mGluRs), which decrease transmitter release when activated. To investigate the influence of glial coverage on synaptic function, Oliet et al. (2001) tested synaptic function during different degrees of synaptic-coverage. In virgin rats, where synapses are tightly ensheathed by glia, blockade of glial glutamate transporters decreased the amplitude of evoked currents and increased paired-pulse facilitation (PPF) ratio. This is due to pre-synaptic mGluR activation by high levels of synaptic glutamate. Interestingly, blocking glial transporters had a reduced effect in lactating rats where glial coverage is reduced. These results suggest that glutamate handling in the SON is markedly changed during lactation. In virgin animals, glial cells tightly regulate the concentration of glutamate in the synaptic cleft, keep-

ing it relatively low. However, during lactation, withdrawal of glial cell processes from the synapse results in decreased glutamate clearance and higher levels glutamate in the synapse.

The decrease in glial coverage and higher levels of glutamate in the synaptic cleft could affect the spillover of transmitter from the synaptic cleft. Not only does glial morphology affects this phenomenon, but their transporters are also important for removal of glutamate from synapses (Bergles and Jahr, 1998; Rothstein et al., 1996; Tanaka et al., 1997). Synaptic spillover may have implications for synaptic crosstalk, heterosynaptic plasticity and overall functioning of the brain. Synaptic crosstalk was investigated in the SON in the context of heterosynaptic depression (Piet et al., 2004). This was an extension of the above model, where synaptic crosstalk between SON glutamatergic synapses causes heterosynaptic depression in neighbouring GABAergic neurons through pre-synaptic mGluRs. Piet et al. (2004) recorded the amount of GABAergic depression due to glutamate spillover and activation of pre-synaptic mGluRs. They observed that extracellular diffusion was facilitated and that depression was twice as pronounced in lactating animals in comparison to virgin ones. This suggests reduced glial coverage, which agrees with the electrophysiological data that indicate a greater level of glutamate diffusion, and increased heterosynaptic depression in lactating rats.

These experiments indicate a clear role for glial cells in the regulation of synaptic function and reveal the complexity of such plasticity events involving non-neuronal elements. In this system, glial-dependent homosynaptic plasticity occurs in a glutamatergic pathway while more complex heterosynaptic depression can also occur in a different GABAergic pathway. This is an interesting example of how glial cells can directly impact not only a single synapse, but also, in more complex fashion on multiple synapses. The question that now remains is; what are the functional implications of a neuro-glial environment and neuro-glial plasticity in a given brain region?

3.3. Glia and short-term synaptic plasticity

Short-term plasticity of synaptic efficacy is widely expressed in the nervous system and is a form of plasticity for which a glial contribution has been found and well characterized. In the following section we will discuss evidence for glia-mediated short-term plasticity in simple and complex synaptic environments.

3.3.1. Short-term plasticity in the PNS

The neuromuscular junction (NMJ) is a useful model of a simple synapse that demonstrates purely homosynaptic plasticity in an intact preparation. Importantly, it allows specific manipulation of all three of the synaptic compartments: the pre-synaptic terminal, the post-synaptic muscle fibre, and the perisynaptic Schwann cell (PSC), the glial cell at this synapse. The NMJ has been used as a reliable model

for studying the tripartite synaptic function (pre, post and glia). The first studies of neuron–glia interactions at the NMJ demonstrated that PSCs could respond to nerve activity with Ca^{2+} elevations (Jahromi et al., 1992; Reist and Smith, 1992) and these elevations were frequency-dependent (Jahromi et al., 1992). Is PSC activation at the NMJ a simple response to high activity or could they reciprocally modulate nerve activity? This was investigated by Robitaille (1998) by monitoring NMJ plasticity while specifically activating or inactivating glial cells. He showed that interfering with the G-protein-coupled receptors on PSCs disrupted the NMJ high frequency-induced depression (Fig. 1A). Also, G-protein activation of PSCs caused a decrease in nerve activity during 0.2 Hz stimulation. However, the injection did not have any effect on spontaneous release or PPF. These results suggest that PSC activation can modulate homosynaptic plasticity during high frequency depression at the NMJ.

A later study, performed by the same group, demonstrated a further role for PSCs in the modulation of NMJ function. This was done by direct and specific Ca^{2+} -mediated activation or inactivation of glial cells. Direct activa-

tion of the IP_3 cascade caused a potentiation of neurotransmission at 0.2 Hz (Castonguay and Robitaille, 2001). Furthermore, during 10 Hz stimulation, injection of PSCs with the Ca^{2+} chelator BAPTA induced greater depression (Fig. 1B). This suggests that the release of Ca^{2+} from internal stores results in a potentiation of transmitter release. These results suggest that not all PSC G-protein signaling operates through the same mechanisms, and that the capacity exists for the PSCs to mediate bidirectional modulation of homosynaptic plasticity in neuromuscular function.

Recent work by this group proposes that glutamate may be the glio-transmitter involved in the PSC-mediated depression. Pinard et al. (2003) demonstrated the presence of mGluR mediated depression of neuromuscular transmission and investigated evoked (EPPs) and spontaneous end-plate potentials (MEPPs) at the frog NMJ. They found a decrease in evoked EPP amplitude and MEPP frequency but not in MEPP amplitude in the presence of glutamate or a glutamate agonist. This suggests that glutamate reduced transmitter release. However, immunohistochemical staining for mGluR subunits suggested that these receptors were located on the muscle fibre. How then is glutamate having a pre-synaptic effect on neurotransmitter release?

An earlier study from the same laboratory demonstrated that nitric oxide (NO) scavengers could decrease the level of high-frequency depression at the NMJ (Thomas and Robitaille, 2001). Furthermore, evoked EPP amplitude and spontaneous EPP frequency were both decreased in the presence of NO donors. These effects were similar to what was observed in the presence of glutamate (Pinard et al., 2003). Since NO is thought to be produced in the muscle and PSCs (Descarries et al., 1998), it is possible that the glutamate and NO signaling pathways are coupled. A potential model for this system is one where pre-synaptic release of acetylcholine activates PSCs, inducing release of glutamate from the PSCs, which activates mGluRs on the muscle fibre. Activated mGluRs then stimulate the production of NO, modulating high-frequency depression. It is thought that activation of NO synthase is most likely calcium-dependent since it appears that neuronal NO synthase is present in muscle fibres, but also in PSCs (Descarries et al., 1998).

Recently, Reddy et al. (2003) developed a technique for specifically eliminating PSCs at frog NMJs using an antibody-complement ablation technique. They observed that the absence of PSCs lead to a reduction in synaptic efficacy after 5–7 days. However, they reported no effect of PSC ablation on synaptic transmission and plasticity minutes after the ablation (Reddy et al., 2003). At first, these results may appear in contradiction with those obtained by Robitaille and colleagues. However, such results were somewhat expected. Indeed, data obtained from neuron–myoblast co-cultures in the absence of Schwann cells, revealed that synapses displayed all forms of plasticity, in particular depression, observed at mature NMJs when PSCs are present. Hence, what the culture and ablation experiments

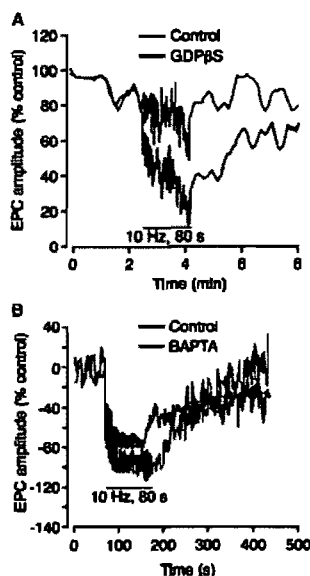


Fig. 1. Bidirectional modulation of synaptic transmission by perisynaptic Schwann cells at NMJs. (A) Injection of GDPβS to inactivate PSC G-protein signaling results in a reduction in synaptic depression. Modified from Robitaille (1998). (B) Injection of the calcium chelator BAPTA into PSCs results in greater depression at the NMJ, revealing a reduction in the potentiation. Modified from Castonguay and Robitaille (2001).

indicate is that the mechanisms of short-term plasticity are pre-synaptic in origin and are modulated by PSCs when these cells are present. This is also consistent with the observation by Robitaille (1998) that blockade of G-protein-coupled receptors in PSCs did not totally prevent synaptic depression. These results indicated that there was an important, fully active pre-synaptic component. Furthermore, since PSCs can potentiate and depress transmitter release it is possible that the effect of PSC ablation may result in a null effect where the lack of potentiation and depression would balance out.

3.3.2. Short-term plasticity in the CNS

The NMJ has proven to be a useful model for investigations of simple synaptic interactions. However, is there evidence for glial involvement in synaptic plasticity in the CNS where synaptic organization and plasticity can involve multiple pathways and complex network interactions? The hippocampus is a laminar structure with well-defined function, characterized cellular interactions and synaptic plasticity. The main cellular elements involved in synaptic plasticity are the pyramidal cells and the inhibitory interneurons (Perez et al., 2001). However, the functional and morphological characteristics of glial cells are consistent with a possible role for these cells in the modulation of certain forms of synaptic plasticity. For instance, it is known that single hippocampal astrocytes contact thousands of synapses (Bushong et al., 2002) and that they are connected together to form large, interconnected networks (Fig. 2) (D'Ambrosio et al., 1998). Furthermore, these cells express receptor types that are similar to the ones present on neurons, are activated by hippocampal activity, and can release glio-transmitters and neuroactive substances known to be involved in various forms of plasticity.

3.3.2.1. Hippocampal plasticity. In the hippocampus, activation of pyramidal neurons has been shown to induce elevations in glial Ca^{2+} levels (Porter and McCarthy, 1996). In addition, elevations in glial Ca^{2+} levels have been shown to be involved in signaling to neurons through glutamate release (Parpura et al., 1994). The impact of glial-to-neuron signaling was investigated in hippocampal culture where the effect of glial glutamate release was investigated during neuronal activity (Araque et al., 1998). These experiments showed that action potential-evoked synaptic transmission was depressed following astrocyte stimulation. This depression involved an increase in glial intracellular Ca^{2+} since it was blocked by BAPTA injection in astrocytes (Araque et al., 1998). Interestingly, impeding the Ca^{2+} activation of glial cells also perturbed the pre-synaptic mGluR-induced depression. Thus, these results suggest that astrocytic glutamate release following Ca^{2+} elevations diffuses pre-synaptically to induce homosynaptic depression. This is a good example of glial modulatory capabilities in the CNS. However, glial cells were stimulated exogenously in these experiments and not by neuronal activity. This leaves

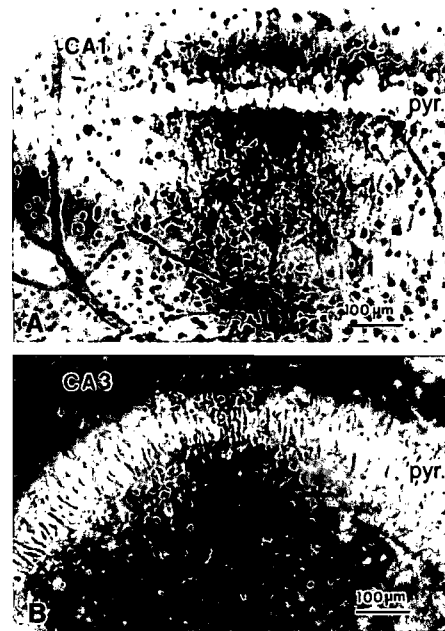


Fig. 2. Heterogeneity of hippocampal glial networks. Electrically coupled astrocytes in area CA1 (A) form larger networks than those in area CA3 (B). Pyr indicates the pyramidal cell layer. Adapted from D'Ambrosio et al. (1998) with permission from the Society for Neuroscience. Copyright 1998 Society for Neuroscience.

the problem of whether glia can respond to neuronal activity and signal back in an intact preparation.

The involvement of glial cells in relation to inhibitory interneurons was investigated by studying the effect of astrocyte signaling on inhibitory currents in hippocampal slices (Kang et al., 1998). In this system, interneurons synapse onto principal neurons of the hippocampus and provide GABA-mediated inhibitory input. The authors demonstrated that stimulation of astrocytes located in close proximity to interneurons could, in turn, stimulate these interneurons through glutamate release. This stimulation resulted in increased frequency of miniature inhibitory post-synaptic currents recorded in pyramidal neurons. They also showed that astrocytes could be activated directly by GABA release from interneurons acting on glial GABA_A receptors. Furthermore, application of GABA_A antagonists disrupted potentiation of inhibitory synaptic transmission (Kang et al., 1998). These data suggest that GABAergic activation of astrocytes potentiates inhibitory synaptic activity through a glia-interneuron to pyramidal neuron loop. It was later shown that this regulatory loop

was mediated by astrocytic glutamate signaling to kainate interneuronal receptors (Liu et al., 2004). These results indicate that astrocytes can modify interneuron activity that subsequently impacts on CA1 pyramidal neuron excitability. In addition, these data indicate that astrocytes can functionally interact with not only excitatory, but also inhibitory synaptic circuits in the hippocampus.

Further support for an involvement of glia in complex synaptic interactions was provided by Poo and colleagues who investigated the role of glial cells in purinergic-mediated depression (Zhang et al., 2003). At CA3–CA1 hippocampal synapses, high frequency activity results in synaptic depression, a rapid and short-lasting form of pre-synaptic depression of transmitter release. This group showed that this depression was indeed a glial-mediated mechanism since it was abolished in the presence of glial inhibitors (fluoroacetate and octanol) or in the absence of glial cells in culture preparations (Zhang et al., 2003). Additionally, they showed that during high levels of activity synaptically released glutamate induced intracellular calcium rises in glial cells, triggering ATP release. This extracellular ATP acted homo- and heterosynaptically to induce pre-synaptic depression. Hence, glial cells seem to be a necessary element of ATP-mediated synaptic depression in the hippocampus.

Recent results from our laboratory uncovered a glial involvement in adenosine-mediated heterosynaptic depression at Schaffer collateral synapses (Serrano et al., 2003). We reported that in rat hippocampi, Schaffer collateral tetanization recruits interneurons through NMDA receptors and induces GABA release. Surrounding glial cells show a calcium-dependent activation via GABA_A receptors. It is thought that the Ca²⁺ increase induces ATP release from glial cells, which degrades into adenosine. We demonstrated that adenosine, acting through A1 receptors, heterosynaptically induces depression on Schaffer collaterals. Interestingly, we observed that blocking Ca²⁺-mediated activation of glial cells disrupted the heterosynaptic depression of Schaffer collateral synapses. This suggests that glial cells not only act as complementary elements in neuronal modulation, but are an integrated and necessary components in network plasticity. Based on our results and those of Zhang et al. (2003) we propose that homosynaptic modulation and plasticity that occur locally probably involve a small number of astrocytes and do not require communication within a glial network, whereas, heterosynaptic plasticity phenomena are based upon glial communication that occurs throughout a glial syncytium. Although the mechanisms involved in these two studies are different, they suggest that glial cells are essential elements of hippocampal plasticities.

3.3.2.2. Retinal modulation by glial calcium waves. The data presented above indicate that astrocytes can modulate synaptic plasticity over a large area owing to a large degree of glial interconnectivity. This suggests that glial cell networks could be important for signaling over long distances. Glial

morphology and interconnectivity vary in different brain regions (D'Ambrosio et al., 1998) suggesting a differential influence on local brain function. Evidence for neuronal modulation through glial networks has also been obtained by Newman and Zahs (1998) in the retina. In the isolated retina, astrocytes and radial Müller glia form networks that can propagate Ca²⁺ waves over long distances (400 μm) (Newman and Zahs, 1998). This *in situ* preparation responds to light stimuli with changes in neuronal firing rate. Newman and Zahs (1998) investigated whether glial calcium waves could alter neuronal activity, therefore, implicating glial cells in regional modulation. Initial experiments demonstrated that neuronal firing rates were either increased, or decreased at the time a calcium wave reached a glial cell neighbouring the recorded neuron (Newman and Zahs, 1998). Increases in firing rate were only observed in ON cells, whereas decreases were observed in all cell types, suggesting that glial cells could differentially modify neuronal function based on the neuronal phenotype. Furthermore, changes in neuronal activity were not observed when glial calcium waves did not reach the recorded neuron or in the presence of glycine, GABA or glutamate antagonists. Modulation of firing rate was observed at an average distance of 60 μm indicating that glia could affect neuronal activity over moderate distances.

3.3.2.3. Neuronal synchrony. Other results have recently come to light that suggest that glia could be involved in synchronization of neural activity. Two studies were published showing that in the hippocampal CA1 region, astrocytic release of glutamate synchronously activated neighbouring neurons through extrasynaptic NMDA receptors (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004). In one of the studies, Carmignoto and co-workers (2004) showed that inward currents could occur synchronously in two pyramidal neurons when astrocytes are stimulated by an mGluR agonist. Interestingly, this effect was observed in the presence of TTX, suggesting that glial cells mediated the effect. These results were also reproduced by specifically elevating Ca²⁺ in astrocytes. These authors showed that the synchronization by glial cells was activated by neuronal activity itself, indicating the involvement of a reciprocal neuron–glia regulatory feedback loop. Additionally, both of these studies indicated that synchronous activation was spatially restricted to neurons with less than 100 μm separation (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004). This suggests some intrinsic property associated with the regional glial network that imparts a spatially limited degree of synchronization.

Overall, work with CNS synapses in cultures and slices reveal that glial cells can receive, send and dynamically modulate neuronal function. This is occurring in direct homosynaptic neuron–glial interactions, and in more complex synaptic loops. These results challenge classical ideas as they strongly implicate glial cells in many forms of synaptic plasticity. It is also interesting to note the similarities that exist in the studies that have used semi-intact models.

For instance, glial cells seem able to modulate homosynaptic events as seen in the SON, NMJ and during high levels of activity in the hippocampus through release of ATP. These events can occur through glial plasticity, through sensing neuronal activity and modulating it in return. Furthermore, glia can be important for interactions between different groups of neurons and in heterosynaptic plasticity as reported by Kang et al. (1998) and Serrano et al. (2003). Based on the evidence for frequency-dependent neuron–glial interactions in various forms of plasticity, it appears that ideas of neuronal networks should consider glial cells as interconnected partners. The extent of the glial interconnectivity of a given region is likely to be important in determining the degree of the glial modulation. For example, it is known that glial cells in the hippocampal CA1 region form larger networks than those in the CA3 region (Fig. 2) (D'Ambrosio et al., 1998). Therefore, could glial modulation be more spatially restricted in the CA3 region and what could be the functional consequences of such a difference?

The impact and the function of glia on local and regional environments are diverse and appear to adjust to the complexity of the environment. Hence, it is likely that perisynaptic glial cells play many more roles than have yet been investigated. This leaves many unaddressed questions surrounding the field of synaptic plasticity and neuron–glial interactions. Below we will briefly discuss some areas of study that may be promising for elucidating the role of glia in synaptic plasticity.

4. Further glial involvement

There are many other instances of plasticity where glial cells are well positioned anatomically and functionally to respond and signal to neurons. However, addressing the question of glial involvement is not always the easiest task. Thus we will next discuss some plasticity events where glial cells have not been directly implicated, but in which their involvement is possible considering available information and general glial cell properties.

4.1. Cerebellar plasticity and glia

The cerebellum is a well conserved, highly ordered structure. Long-term depression (LTD) is a well-characterized form of cerebellar plasticity that is proposed to be important for fine motor control (Boyden et al., 2004). Cerebellar LTD is observed at glutamatergic synapses between granule cell parallel fibres (PFs) and Purkinje cells (PCs). The induction of LTD in the cerebellum has been shown to be at least partially dependent on NO (Lev-Ram et al., 1997; Lev-Ram et al., 1995) that acts post-synaptically on PCs. The source of NO remains to be determined although it appears not to originate from the PCs themselves (Lev-Ram et al., 1995).

Obviously, there are important pre- and post-synaptic mechanisms involved in the induction of LTD, but could

there be a role for Bergmann glia? For instance, Bergmann glia show the highest levels of NO synthase activity (Kugler and Drenckhahn, 1996), they are closely associated with PF–PC synapses and can respond to PF activity (Grosche et al., 1999). Glial modulation of long-term plasticity would not mean that neuronal processes are not important. Simply that both glial and neuronal influences likely have different roles in the full expression of cerebellar LTD. In this system glial cells may modify or support the neuronal processes.

4.2. Long-term changes in the hippocampus

It is a daunting task to address the question of glial involvement in long-term potentiation (LTP) or LTD in the hippocampus. Moreover, it is not until recently that evidence was obtained to support such a role for glia. Two signaling pathways have been found by which glial cells can modulate NMDA-dependent glutamatergic transmission. The first series of evidence involves D-serine, a co-agonist acting on the glycine site at NMDA-type glutamate receptors, known to be necessary for the induction of hippocampal LTP (Bashir et al., 1990; Oliver et al., 1990). NMDA receptor activation can be a necessary step in activity-dependent LTP induction (Bliss and Collingridge, 1993). Additionally, both glutamate and glycine sites on NMDA receptors must be filled for activation. Using mixed cultures and hippocampal slices, it was reported that glial release of D-serine was necessary to induce NMDA-type LTP (Yang et al., 2003). In the presence of glycine site blocker, or in the absence of glial cells, LTP could not be induced. Thus, these results suggest that astrocytes also play a key role in long-term synaptic plasticity. The second series of experiments is related to TNF α . As discussed previously, TNF α is a protein that increases surface expression of neuronal AMPA receptors. It has been shown that TNF α , released by glial cells, increases synaptic efficacy. Glial release of TNF α is another key mechanism of glial control of glutamatergic plasticity since continuous presence of this molecule is necessary to maintain synaptic strength.

Given the importance of AMPA and NMDA receptors in LTP and LTD (Luscher et al., 2000), these results suggest that glial cells can release at least three glio-transmitters that can be involved in these types of long-term plasticity: glutamate, D-serine and TNF α . The above results are consistent with observations from glial specific knockout mice where LTP was modified, providing further support for a glial involvement in LTP (McCall et al., 1996; Nishiyama et al., 2002). It will be of interest to investigate in more detail the putative involvement of glial cells in NMDA and AMPA receptor-mediated types of plasticity.

5. Conclusion

In this review, evidence has been presented demonstrating that glial cells not only play a supportive role for

neuronal activity, but that they are also involved in the regulation of neuronal network plasticity. From simple homosynaptic modulation to complex hippocampal plasticity, the tripartite synapse is the basis of these interactions and modulations. Owing to the plasticity of glial cells, their heterogeneity and their exquisite sensitivity to neuronal activity and synaptic transmission, it is fascinating to hypothesize that glial cells could have central roles in many different forms of plasticity. Evidence suggests that glia and neurons should no longer be considered independent cellular elements in the nervous system, but rather two interrelated, interconnected pathways involved in information processing and plasticity.

References

- Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., Audinat, E., 2004. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 6920–6927.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1998. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2129–2142.
- Ballice-Gordon, R.J., 1996. Dynamic roles at the neuromuscular junction. Schwann cells. *Curr. Biol.* 6, 1054–1056.
- Bashir, Z.I., Tam, B., Collingridge, G.L., 1990. Activation of the glycine site in the NMDA receptor is necessary for the induction of LTP. *Neurosci. Lett.* 108, 261–266.
- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., Malenka, R.C., 2002. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295, 2282–2285.
- Bergles, D.E., Jahr, C.E., 1998. Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral commissural synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 7709–7716.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Boyden, E.S., Katoh, A., Raymond, J.L., 2004. Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Ann. Rev. Neurosci.* 27, 581–609.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H., 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- Castonguay, A., Robitaille, R., 2001. Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J. Neurosci.* 21, 1911–1922.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C., Mullen, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Moshier, D.F., Bornstein, P., Barres, B.A., 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433.
- D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P.A., McKhann II, G.M., Janigro, D., 1998. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 18, 4425–4438.
- Descarries, L.M., Cai, S., Robitaille, R., Josephson, E.M., Morest, D.K., 1998. Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* 27, 829–840.
- Dunaevsky, A., Tashiro, A., Majewska, A., Mason, C., Yuste, R., 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13438–13443.
- Dunaevsky, A., Blazeski, R., Yuste, R., Mason, C., 2001. Spine motility with synaptic contact. *Nat. Neurosci.* 4, 685–686.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., Carmignoto, G., 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., Matus, A., 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847–854.
- Grosche, J., Matyash, V., Moller, 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.
- Jahromi, B.S., Robitaille, R., Charlton, M.P., 1992. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8, 1069–1077.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1, 683–692.
- Kugler, P., Drenckhahn, D., 1996. Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. *Glia* 16, 165–173.
- Lev-Ram, V., Makings, L.R., Keitz, P.F., Kao, J.P., Tsien, R.Y., 1995. Long-term depression in cerebellar Purkinje neurons results from coincidence of nitric oxide and depolarization-induced Ca²⁺ transients. *Neuron* 15, 407–415.
- Lev-Ram, V., Jiang, T., Wood, J., Lawrence, D.S., Tsien, R.Y., 1997. Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca²⁺ in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron* 18, 1025–1038.
- Liu, Q.S., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., Nedergaard, M., 2004. Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3172–3177.
- Luscher, C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Muller, D., 2000. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* 3, 545–550.
- Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E.C., Otto, A., Pfrieger, F.W., 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294, 1354–1357.
- McCall, M.A., Gregg, R.G., Behringer, R.R., Brenner, M., Delaney, C.L., Galbreath, E.J., Zhang, C.L., Pearce, R.A., Chiu, S.Y., Messing, A., 1996. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6361–6366.
- Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y., Pasquale, E.B., 2003. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat. Neurosci.* 6, 153–160.
- Newman, E.A., Zahs, K.R., 1998. Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J. Neurosci.* 18, 4022–4028.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S., Itoharu, S., 2002. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4037–4042.
- Oliet, S.H., Piet, R., Poulain, D.A., 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292, 923–926.
- Oliver, M.W., Kessler, M., Larson, J., Schottler, F., Lynch, G., 1990. Glycine site associated with the NMDA receptor modulates long-term potentiation. *Synapse* 5, 265–270.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęfünija, K., Jęfünija, S., Haydon, P.G., 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Peng, H.B., Yang, J.F., Dai, Z., Lee, C.W., Hung, H.W., Feng, Z.H., Ko, C.P., 2003. Differential effects of neurotrophins and Schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 23, 5050–5060.
- Perez, Y., Morin, F., Lacaille, J.C., 2001. A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9401–9406.
- Pfrieger, F.W., Barres, B.A., 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277, 1684–1687.
- Piet, R., Vargova, L., Sykova, E., Poulain, D.A., Oliet, S.H., 2004. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2151–2155.
- Pinard, A., Levesque, S., Vallee, J., Robitaille, R., 2003. Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3241–3250.

- Porter, J.T., McCarthy, K.D., 1996. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16, 5073–5081.
- Portera-Cailliau, C., Pan, D.T., Yuste, R., 2003. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J. Neurosci.* 23, 7129–7142.
- Reddy, L.V., Koirala, S., Sugiura, Y., Herrera, A.A., Ko, C.P., 2003. Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron* 40, 563–580.
- Reist, N.E., Smith, S.J., 1992. Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7625–7629.
- Robitaille, R., 1998. Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21, 847–855.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., Robitaille, R., 2003. Involvement of glial cells in heterosynaptic depression at hippocampal Schaffer collateral pyramidal cell synapses. *Soc. Neurosci. Abstracts*.
- Son, Y.J., Thompson, W.J., 1995. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14, 125–132.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A., 1993. Activity-dependent neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57, 501–535.
- Thomas, S., Robitaille, R., 2001. Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J. Neurosci.* 21, 1087–1095.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2001. Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657–661.
- Ullian, E.M., Harris, B.T., Wu, A., Chan, J.R., Barres, B.A., 2004. Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol. Cell Neurosci.* 25, 241–251.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S., 2003. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15194–15199.
- Zhang, J.M., Wang, H.K., Ye, C.Q., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z.L., Wu, C.P., Poo, M.M., Duan, S., 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971–982.