

THESE PRESENTEE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE, SPECIALITE NEUROSCIENCES

PAR

Dorian ARNOUIL

Étude de la régulation de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique à long terme par l'astrocyte dans l'hippocampe adulte.

SOUS LA DIRECTION DE

Aude PANATIER

Soutenue le 13 Décembre 2021

Membres du jury :

M. AUDINAT Étienne	Directeur de recherche (Montpellier)	Rapporteur
Mme. GALANTE Micaela	Professeure (Paris-Saclay)	Rapporteuse
M. BOUÉ-GRABOT Éric	Directeur de recherche (Bordeaux)	Examineur
Mme. PANATIER Aude	Chargée de recherche (Bordeaux)	Directrice de thèse

Résumé (Français)

Le fonctionnement du cerveau repose sur la communication entre les neurones au niveau de structures spécialisées : les synapses. La transmission synaptique est plastique et finement régulée au cours du temps. Dans l'hippocampe la plasticité synaptique à long terme serait la base cellulaire de la mémoire. De plus, il est important de noter que les neurones ne sont pas seuls dans le cerveau et que les cellules gliales remplissent de nombreuses fonctions essentielles à son fonctionnement. Parmi elles, les astrocytes, idéalement positionnés entre les vaisseaux et les synapses, jouent un rôle clé dans la régulation de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique à long terme. Pour ce faire les astrocytes sont capables de détecter les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique et en retour de libérer des gliotransmetteurs comme les purines et la D-sérine. Dans l'hippocampe de rats juvéniles, les astrocytes régulent l'efficacité de la transmission synaptique de base à l'échelle d'une synapse. De plus, chaque astrocyte occupe un territoire, ou domaine, exclusif au sein duquel il est en apposition étroite avec plus de 100 000 synapses voisines, appartenant à plusieurs neurones. Sur le plan fonctionnel cela pourrait leur permettre de coordonner la régulation la transmission à l'échelle de 100 000 synapses.

Le but principal de ma thèse est de mieux comprendre comment l'information est transmise et régulée à l'âge adulte dans l'hippocampe. Pour cela, j'ai étudié le rôle de l'astrocyte dans la régulation de l'efficacité de la transmission synaptique à l'échelle de la synapse unique et du domaine. A l'aide de techniques d'électrophysiologie, en combinant des approches pharmacologiques et virales, les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence que :

(1) L'astrocyte, à l'âge adulte est toujours capable de réguler l'efficacité de la transmission synaptique de base à l'échelle de la synapse unique. Pour se faire, l'astrocyte détecte le glutamate libéré dans la fente synaptique via le récepteur glutamatergique métabotropique de type 5 (mGluR5) et en retour libère des purines lui permettant d'augmenter l'efficacité de la transmission synaptique via leur action sur des récepteurs à l'adénosine présynaptique de type A_{2A} . De manière très intéressante, cette régulation semble être dépendante de l'activité étant donné qu'elle n'est plus présente lorsque le nombre de synapses activées augmente.

(2) Le mGluR5 est, même chez l'adulte, un récepteur clé pour l'astrocyte puisqu'il est nécessaire au mécanisme de régulation de la transmission par les purines que j'ai étudié. En effet, pour mieux comprendre cette boucle de régulation, j'ai utilisé un nouveau vecteur viral développé en collaboration avec l'équipe de la Dr. Carole Escartin. Ce vecteur permet le blocage du mGluR5 spécifiquement dans les astrocytes par l'expression d'un peptide dominant négatif. Cette technique m'a permis de

démontrer l'importance de ce récepteur astrocytaire dans la régulation de la transmission mais aussi de la plasticité synaptique à long terme.

(3) Dans un second projet, réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean-Michel Revest, j'ai étudié la plasticité synaptique à long terme et son altération dans le contexte du syndrome de Down (SD). Le SD ou trisomie 21, est la cause génétique la plus courante de déficience intellectuelle. Dans cette étude, j'ai mis en évidence que le modèle murin de SD étudié présentait un déficit de plasticité synaptique à long terme qui était dépendant de la signalisation des récepteurs aux endocannabinoïdes (CB1) et qui est corrélé à un déficit de mémoire. La signalisation CB1 étant importante pour la production des gliotransmetteurs nécessaires à l'induction de la plasticité, ces résultats ouvrent des pistes prometteuses pour comprendre l'implication des astrocytes dans les déficits cognitifs du SD.

Mots clés : Astrocytes ; Gliotransmission ; Plasticité synaptique ; Electrophysiologie ; mGluR5 ; Purines ; Syndrome de Down

Laboratoire

Neurocentre Magendie - INSERM U1215

Equipe « Relation Glie-Neurone » dirigée par Stéphane Oliet

146 Rue Léo Saignat

33000 BORDEAUX

Abstract (English)

Study of the regulation of synaptic transmission and long-term synaptic plasticity by the astrocyte in adult hippocampus.

The functioning of the brain relies on communication between neurons at the level of specialized structures: the synapses. Information processing at synapses is plastic and finely modulated over time. In the hippocampus, this cellular plasticity is proposed as the cellular basis of learning and memory. It is important to note that neurons are not alone in the brain, glial cells perform many functions essential to its functioning. Among them, astrocytes, ideally positioned in between blood vessels and synapses, play a key role in modulating transmission and long-term synaptic plasticity. Indeed, works done in recent years have shown that astrocytes are able to detect neurotransmitters released in the synaptic cleft and in turn to regulate the efficiency with which neurons communicate. To do this, astrocytes, like neurons, release gliotransmitters at the synapse, as purines and D-serine. In the hippocampus, it has been shown in juvenile rats that astrocytes are able to regulate the efficiency of synaptic transmission at the level of a single synapse. In addition, each astrocyte occupies an exclusive territory allowing it to be in close apposition with more than 100,000 neighboring synapses belonging to several neurons. Functionally, this may allow them to coordinate the regulation of transmission at the scale of 100,000 synapses.

The main goal of my thesis was to better understand how information is transmitted and regulated in the hippocampus in adulthood. To this end, I studied the role of astrocytes in regulating the efficiency of synaptic transmission at the single synapse and domain levels. Using electrophysiological techniques, combining pharmacological and viral approaches, the work I performed during my thesis revealed that:

(1) The astrocyte, in adulthood is still able to regulate the efficiency of basic synaptic transmission at the single synapse level. To do so, the astrocyte detects glutamate released in the synaptic cleft via the metabotropic glutamatergic receptor type 5 (mGluR5) and in return releases purines allowing it to increase the efficiency of synaptic transmission via their action on presynaptic adenosine receptors type A_{2A} . Interestingly, this regulation seems to be activity-dependent since it is no longer present when the number of activated synapses increases.

(2) The mGluR5, even in the adult hippocampus, is a key receptor for the astrocyte since it is necessary for the mechanism of regulation of transmission by purines that I studied. Indeed, to better understand this regulatory loop, I used a new viral vector developed in collaboration with Dr. Carole Escartin's team. This vector allows to functionally block mGluR5 pathway specifically in astrocytes by the

expression of a dominant negative peptide. This technique allowed me to demonstrate the importance of this astrocytic receptor in the regulation of basal synaptic transmission and long-term synaptic plasticity.

(3) In collaboration with Dr. Jean-Michel Revest's team, I study long-term synaptic plasticity and its alteration in the context of Down syndrome (DS). DS or trisomy 21, is the most common genetic cause of intellectual disability. In this study, I demonstrated that the mouse model of DS studied showed a deficit in long-term synaptic plasticity that was dependent on endocannabinoid receptor signaling (CB1) and correlated with a memory deficit. As CB1 signaling is important for the production of gliotransmitters necessary for the induction of plasticity, these results open new perspectives to understand the involvement of astrocytes in cognitive deficits of DS.

Keywords : Astrocytes ; Gliotransmission ; Synaptic plasticity ; Electrophysiology ; mGluR5 ; Purines ; Down syndrome.

Sommaire

Résumé (Français)	ii
Abstract (English)	iv
Remerciements	Erreur ! Signet non défini.
Sommaire	vi
Liste des abréviations	ix

Introduction

Chapitre 1 : L'astrocyte, en conditions physiologiques, régule la transmission synaptique en libérant des purines	2
1. Transmission synaptique dans le système nerveux	2
1.1. Neurone	2
1.2. La synapse	3
1.2.1. Synapse électrique	3
1.2.2. Synapse chimique	3
2. Transmission synaptique et plasticité dans l'hippocampe	6
2.1. Rôle de l'hippocampe	6
2.2. Anatomie de l'hippocampe	7
2.2.1. Structure du réseau de neurones	7
2.2.2. Organisation laminaire du CA1	9
2.3. Plasticité synaptique dans l'hippocampe	9
2.3.1. Plasticité à court terme	10
2.3.1.1. Probabilité de libération des neurotransmetteurs	10
2.3.1.2. « Paired-Pulse Facilitation » et « Paired-Pulse Depression »	11
2.3.1.3. Plasticité induite par stimulations répétées	12
2.3.2. Plasticité à long terme	15
2.3.2.1. LTP	15
2.3.2.2. LTD	17
3. L'astrocyte, un partenaire des neurones au cours de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique à long terme	20
3.1. Les cellules gliales	20
3.2. Caractérisation de l'astrocyte	21
3.2.1. Caractéristiques morphologiques	21
3.2.2. Identification des astrocytes	23

3.3.	Fonction de l'astrocyte	24
3.3.1.	Interactions avec les vaisseaux sanguins.....	24
3.3.2.	Support métabolique pour les neurones	26
3.3.3.	Homéostasie de l'eau et des ions.....	26
3.3.4.	Recapture du glutamate.....	26
3.3.5.	Réseaux.....	27
3.3.5.1.	Jonctions communicantes	27
3.3.5.2.	Syncytium astrocytaire	28
3.4.	Synapse tripartite et gliotransmission.....	28
3.4.1.	Processus astrocytaires périssynaptiques	28
3.4.2.	Détection du signal.....	29
3.4.3.	Intégration	31
3.4.4.	Gliotransmission.....	32
4.	Modulation de la transmission synaptique de base et de la plasticité par les purines astrocytaires dans l'hippocampe	35
4.1.	Détection par le récepteur mGluR5	35
4.1.1.	Structure et caractéristiques du récepteur	35
4.1.2.	Interaction avec Homer.....	38
4.1.3.	Rôles du mGluR5 astrocytaire	39
4.2.	Rôle des purines astrocytaires	40
4.2.1.	Métabolisme des purines	40
4.2.2.	Régulation de la transmission synaptique dans l'hippocampe par les purines ...	43
4.2.2.1.	Libération de purines	43
4.2.2.2.	Les récepteurs purinergiques.....	44
4.2.2.3.	Physiopathologie de la transmission purinergique	53
4.3.	Rôle de la D-sérine astrocytaire	54
Chapitre 2 :	L'astrocyte est impliqué dans la dérégulation de la transmission en conditions pathologiques	55
1.	L'astrocyte en conditions pathologiques	55
1.1.	Réactivité astrocytaire.....	55
1.2.	Impact du changement d'état de l'astrocyte sur la transmission synaptique	56
2.	Le cas du Syndrome de Down	56
2.1.	La pathologie	56
2.1.1.	Epidémiologie	57

2.1.2.	Symptômes cognitifs	57
2.1.3.	Modèles	58
2.1.3.1.	Cellules souches pluripotentes induites.....	58
2.1.3.2.	Souris transgéniques	58
2.2.	Les altérations de transmission et de la plasticité synaptique.....	61
2.3.	Altération du système endocannabinoïde dans le SD.....	61
2.4.	Implication des astrocytes dans le SD	62
Chapitre 3 : Objectifs de l'étude.....		62
Résultats		
Etude n°1 : Astrocytic control of basal synaptic transmission is activity dependent.		65
Figures complémentaires		103
Etude n°2 : Pregnenolone rescued hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory impairments in Ts65Dn Down syndrome mouse model.....		106
Discussion		
Etude n°1 : Astrocytic control of basal synaptic transmission is activity dependent		152
Résumé des résultats		152
Le mGluR5 est exprimé par l'astrocyte adulte		152
Le mGluR5 astrocytaire est fonctionnel chez l'adulte.....		153
Autres moyens de détection de la neurotransmission pour l'astrocyte.....		154
La régulation liée à l'astrocyte dépend du nombre de synapses activée		155
Développement d'un virus permettant le blocage de la signalisation mGluR5 astrocytaire.....		156
La modulation purinergique de la transmission via le mGluR5 semble spécifiquement impliquer les récepteurs à l'adénosine présynaptiques.....		158
La signalisation mGluR5 est importante pour la régulation de la LTP		159
Etude n°2 : Pregnenolone rescued hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory impairments in Ts65Dn Down syndrome mouse model.....		161
Résumé des résultats		161
Les souris Ts65Dn présentent un déficit de LTP.....		161
La prégnénolone restaure la LTP.....		162
Rôle des astrocytes.....		162
Bibliographie		

Table des illustrations

Figure 1 : Synapses chimique et électrique.....	5
Figure 2 : Anatomie de l'hippocampe..	8
Figure 3 : Mécanismes de plasticité à court terme.....	14
Figure 4 : Mécanismes de plasticité à long terme.....	19
Figure 5 : Morphologie des astrocytes.....	25
Figure 6 : Le processus astrocytaire périssynaptique	34
Figure 7 : Structure du mGluR5.....	37
Figure 8 : Métabolisme des purines.	42
Figure 9 : Signalisation intracellulaire des récepteurs à l'adénosine.	51
Figure 10 : Souris Ts65Dn, modèle du syndrome de Down	60

Liste des abréviations

2-AG :	2-arachidonylglycérol
Acs-1 :	Alanine-serine-cysteine transporter-1
ADA :	Adénosine Déaminase
Adok :	Adénosine kinase
ADP :	Adénosine diphosphate
AEA :	Anandamide
AMP :	Adénosine monophosphate
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPC :	Adénosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	Adénosine triphosphate
BDNF :	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CA 1-4 :	Corne d'Ammon 1-4
Ca ²⁺ :	Ion calcium (Dans cette thèse le nom de l'élément est parfois utilisé comme synonyme pour désigner l'ion)
CamKII :	Protéine kinases Ca ²⁺ /calmoduline-dépendantes
CB1 :	Récepteur aux endocannabinoïdes 1
CB2 :	Récepteur aux endocannabinoïdes 2
CCVD :	Canaux calciques voltage dépendants
CREB :	C-AMP Response Element-binding protein
CSPi :	Cellule souche pluripotente induite
DAG :	Diacylglycérol
EAAT 1/2 :	Excitatory amino acid transporter 1/2
ENT 1/2 :	Transporteur équilibratif de nucléosides 1/2
EVH1 :	Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) homology 1
GABA :	Acide gamma-aminobutyrique

GFAP : Glial fibrillary acidic protein
 GLAST1 : GLutamate ASpartate Transporter (aussi EAAT1)
 GLT1 : Glutamate transporter 1 (aussi EAAT2)
 GluR1 : Glutamate receptor 1
 Hsa : Chromosome humain (Homo sapiens)
 IP3 : Inositol trisphosphate
 IP3R : Récepteur à l'IP3
 K⁺ : Ion potassium (Le nom de l'élément est parfois utilisé comme synonyme pour désigner l'ion)
 Kir 4.1 : Canaux potassiques voltage-dépendants de type « inward rectifier » 4.1
 KO : Knock-out
 LTD : Long term depression (dépression à long terme)
 LTP : Long term potentiation (potentialisation à long terme)
 MAPK : Mitogen-activated protein kinases
 MCT 1/4 : Monocarboxylate transporter 1/4
 mGluR : Récepteur métabotrope au glutamate
 Mmu : Chromosome de souris (Mus musculus)
 Na⁺ : Ion sodium
 NG2 : Neural/glial antigen 2
 NMDA : N-méthyl-D-aspartique
 P2X : Récepteurs ionotropiques à l'ATP
 P2Y : Récepteurs métabotropiques à l'ATP
 PA : Potentiel d'action
 PAP : Processus astrocytaire périssynaptique
 PKA : Protéine kinase A
 PKC : Protéine kinase C
 PLC : Phospholipase C
 PPD : Paired-pulse depression
 PPF : Paired-pulse facilitation
 PPR : Paired-pulse ratio
 RA₁ : Récepteur à l'adénosine 1
 RA_{2A} : Récepteur à l'adénosine 2A
 RA_{2B} : Récepteur à l'adénosine 2B
 RA₃ : Récepteur à l'adénosine 3
 RAMPA : Récepteur AMPA
 RE : Réticulum endoplasmique
 RNMDA : Récepteur NMDA
 SD : Syndrome de Down
 SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
 SNC : Système nerveux central
 TBS : Theta-burst stimulation
 TNF α : Tumor necrosis factors α
 t-SNARE : Target-SNARE
 VFT : Venus flytrap
 v-SNARE : Vesicular-SNARE

Introduction

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de l'astrocyte dans la régulation de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique en conditions physiologiques et pathologiques. Ma thèse est présentée sous forme de deux axes distincts. Au cours d'une première étude, je me suis intéressé à la régulation de la transmission synaptique de base et de la plasticité par les purines astrocytaires en conditions physiologiques. Ce travail, qui est l'objet principal de ma thèse, est introduit dans le chapitre 1. Dans une seconde étude réalisée en collaboration avec une autre équipe, j'ai étudié la plasticité synaptique dans le contexte du syndrome de Down. Cette partie est introduite dans le chapitre 2.

Chapitre 1 : L'astrocyte, en conditions physiologiques, régule la transmission synaptique en libérant des purines

Après de brefs rappels sur la transmission synaptique dans le cerveau, je présenterai l'hippocampe et les mécanismes de plasticité synaptique qui y sont présents. J'introduirai ensuite les astrocytes, en décrivant en particulier leur rôle dans la transmission synaptique. Enfin, je parlerai plus en détails de la détection de l'activité neuronale par le récepteur glutamatergique métabotrope 5 (mGluR5) astrocytaire, de la libération de purines et de leur rôle de modulateur de la transmission.

1. Transmission synaptique dans le système nerveux

1.1. Neurone

Les neurones représentent la moitié de l'ensemble des cellules du cerveau (Azevedo et al., 2009). Ce sont des cellules très polarisées et hautement spécialisées à l'origine du transfert de l'information dans le système nerveux. Très brièvement, un neurone est constitué d'un corps cellulaire dans lequel se trouve le matériel génétique au sein du noyau et de prolongements permettant la réception et la transmission d'informations, respectivement les dendrites et l'axone (Luo, 2021). Ces cellules ont la particularité de communiquer de manière rapide et complexe. En effet l'information se propage très rapidement le long de l'axone des neurones (jusqu'à 1m chez l'homme) sous la forme d'un signal électrique. Puis ce signal est transmis au neurone suivant qui reçoit l'information au niveau d'une structure spécialisée : la synapse.

Les neurones dans le cerveau ne sont pas distribués de manière homogène. On distingue des zones où sont présents les corps cellulaires des neurones, leurs dendrites et les axones courts. Il s'agit de la substance grise, dans laquelle on retrouve les synapses. Elle est constituée des différentes structures cérébrales : le cortex à la surface du cerveau et les noyaux gris centraux comme l'hippocampe, le thalamus ou les ganglions de la base en profondeur. Entre ces noyaux gris, on retrouve la substance

blanche. Celle-ci est constituée de fibres de projection, qui sont des axones myélinisés projetant vers d'autres structures, vers l'autre hémisphère ou vers le système nerveux périphérique.

1.2. La synapse

Mise en évidence par Charles Scott Sherrington en 1906, la synapse est une structure spécialisée qui permet le passage d'information de neurone en neurone (Di Maio, 2021). D'une manière générale, la communication entre cellules peut se faire de deux façons : soit par une mise en contact directe des cytoplasmes de deux cellules adjacentes, soit par la diffusion de molécules dans l'espace extracellulaire qui transmettent un signal en interagissant avec des protéines d'une ou plusieurs cellules cibles. Dans le cas de la neurotransmission, on retrouve ces deux formes de communication avec les synapses électriques et les synapses chimiques.

1.2.1. Synapse électrique

La synapse électrique consiste en une connexion physique entre le cytoplasme de deux cellules. Cette connexion se fait par l'intermédiaire de jonctions communicantes (décrites dans la partie 3.3.5). Celles-ci permettent de coupler électriquement les cellules car elles laissent passer librement les charges électriques. Étant donné que l'information se propage directement d'une cellule à l'autre sous forme d'un courant électrique, les synapses électriques sont les plus efficaces en ce qui concerne la vitesse de transfert de l'information. Elles forment également un couplage métabolique, car elles permettent les échanges de différentes petites molécules.

Ces synapses ont surtout été étudiées chez les poissons et invertébrés aquatiques (Bennett et al., 1963; Furshpan & Potter, 1959). Pour autant, elles sont aussi présentes chez les mammifères, et, bien que leurs fonctions soit peu connues elles suscitent de plus en plus d'intérêt (Nagy et al., 2018; Pereda, 2014). En effet, elles jouent un rôle important dans le développement du cerveau (Peinado et al., 1993) et certaines sont même présentes chez l'adulte (Korn et al., 1973; Nagy et al., 2018). Malgré tout, l'essentiel de la transmission se fait par l'intermédiaire de synapses chimiques dans le cerveau adulte.

1.2.2. Synapse chimique

La synapse chimique est composée d'un élément présynaptique et d'un élément postsynaptique, tous deux séparés par une fente synaptique de 20nm environ. Les deux cellules sont donc physiquement isolées.

La communication de l'élément présynaptique à l'élément postsynaptique se fait de manière chimique par la libération de molécules, appelées neurotransmetteurs. Ils sont contenus dans une

réserve de vésicules présentes dans la terminaison présynaptique. Lorsque le neurone présynaptique est excité par un autre neurone ou par un stimulus externe, l'information se propage d'abord dans la cellule sous forme d'une impulsion électrique : le potentiel d'action (PA) (Di Maio, 2021). Il se propage le long de l'axone jusqu'à atteindre une terminaison synaptique et induit alors l'activation de canaux calciques dépendants du voltage. Ces derniers permettent l'entrée de calcium dans la cellule et l'exocytose de neurotransmetteurs (Katz & Miledi, 1968).

Les neurotransmetteurs ainsi libérés diffusent dans la fente synaptique et activent des récepteurs spécifiques présents à la membrane de la cellule postsynaptique. Il existe des récepteurs ionotropiques et métabotropiques. L'activation d'un récepteur ionotropique permet le passage d'ions, ce qui induit un courant électrique dans le neurone postsynaptique et provoque un changement du potentiel de la membrane postsynaptique. L'activation des récepteurs métabotropiques n'induit pas l'entrée d'ions mais provoque une cascade de signalisations intracellulaires impliquant des seconds messagers qui modulent la transmission.

Les synapses chimiques peuvent être excitatrices ou inhibitrices. Dans le cas des synapses inhibitrices, la liaison des neurotransmetteurs sur les récepteurs génère un courant sortant et diminue l'excitabilité de la cellule en l'hyperpolarisant. Au contraire, la transmission aux synapses excitatrices conduit à courant entrant et une dépolarisation de la cellule. Le principal neurotransmetteur excitateur du SNC est le glutamate. Au niveau de ces synapses glutamatergiques, l'activation des neurones postsynaptiques est principalement médiée par l'ouverture des récepteurs ionotropiques de type AMPA (RAMPA) au potentiel de repos. Il s'agit d'un récepteur canal, il est donc constitué d'un pore. La liaison du glutamate à ce récepteur entraîne un changement de conformation qui permet l'ouverture du pore et le passage de cations. Le RAMPA est généralement perméable aux ions sodium (Na^+) et potassium (K^+). Son ouverture induit un fort influx de Na^+ et un léger efflux de K^+ . La résultante est donc un courant entrant qui dépolarise le neurone postsynaptique (Traynelis et al., 2010). La transmission à une synapse donnée est finement modulée au cours du temps par de nombreux modulateurs et la capacité de transmission d'une synapse peut être modifiée par des mécanismes de plasticité synaptique.

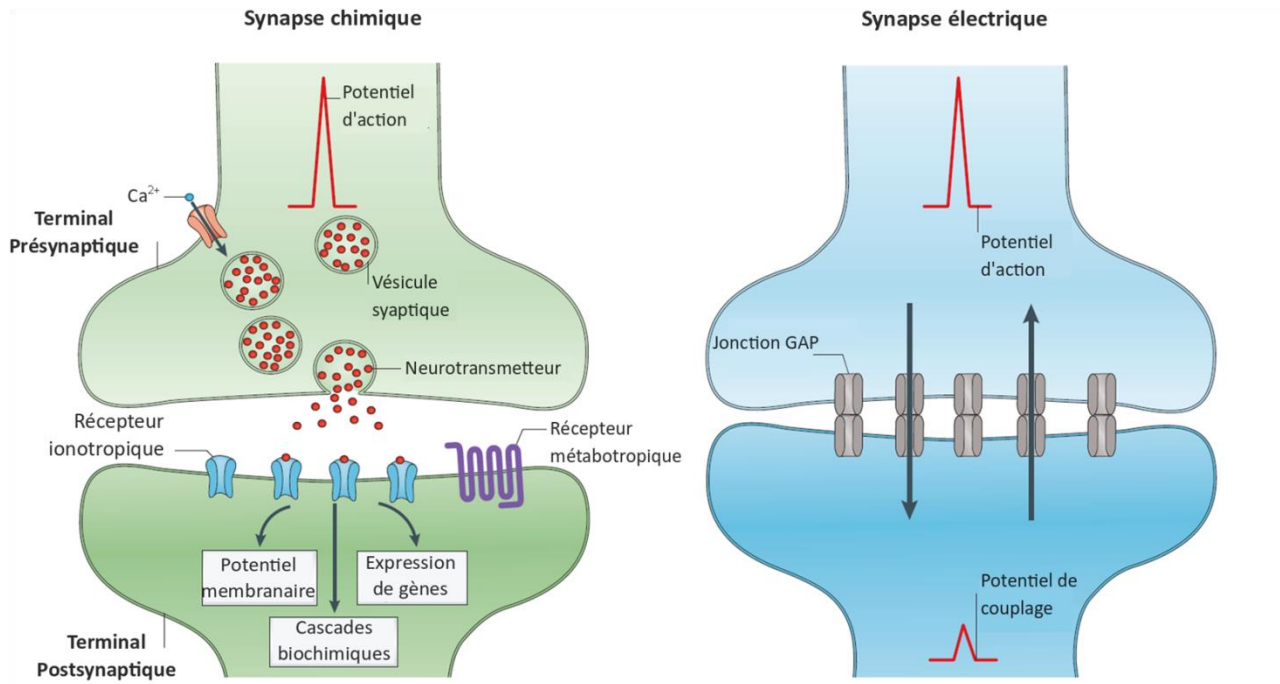


Figure 1 : Représentation schématique d'une synapse chimique et d'une synapse électrique.
Adapté d'après Pereda 2014.

Au cours de ma thèse j'ai étudié le rôle de l'astrocyte dans la régulation de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Je vais donc décrire l'anatomie et le rôle et de cette structure cérébrale puis je décrirai les phénomènes de plasticité synaptique qui y ont lieu.

2. Transmission synaptique et plasticité dans l'hippocampe

2.1. Rôle de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale qui fait partie du système limbique et qui se situe au niveau du lobe temporal médian. Il s'agit d'une structure clé pour la mémoire et la navigation spatiale.

L'implication de l'hippocampe dans la mémoire est connue de longue date. Elle avait été suggérée dès 1900 par Vladimir Bekhterev mais a surtout été reconnue avec l'étude de l'amnésie du célèbre patient H.M. dans les années 1960. Après une ablation chirurgicale bilatérale de l'hippocampe conduite par le Dr Scoville, ce patient a présenté une amnésie antérograde totale et rétrograde partielle (Scoville & Milner, 1957). L'examen clinique de ce patient a conduit à la réalisation d'un grand nombre d'études sur le rôle de l'hippocampe dans la formation de la mémoire. Cette structure est en particulier impliquée dans la formation et dans la consolidation de la mémoire épisodique c'est-à-dire dans la formation des souvenirs (Eichenbaum, 2017).

Une autre fonction très connue de l'hippocampe est le codage des informations spatiales. Cette théorie a vu le jour après la découverte des « cellules de lieu » (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Ce sont des neurones qui s'activent spécifiquement à certains endroits de l'espace lorsque l'animal évolue dans son environnement. Une carte cognitive serait donc encodée par l'activité séquentielle de ces neurones, permettant une représentation mentale de l'environnement.

Les rôles de l'hippocampe dans la mémoire et dans le repérage spatio-temporel pourraient être étroitement liés (Rolls et al., 2002). En effet, la mémoire épisodique est par définition le type de mémoire qui associe un événement à un contexte spatio-temporel. Les cellules de lieu pourraient donc fournir le contexte spatial lors de la formation de cette mémoire (Smith & Mizumori, 2006). De plus, des processus cognitifs propres à l'hippocampe impliqués dans la formation de la mémoire déclarative seraient dépendants des cellules de lieu (Moser et al., 2008). C'est le cas du « pattern completion » qui permet de reconstituer le souvenir d'un événement à partir d'une information partielle et du « pattern separation » qui permet de discriminer une situation similaire à un souvenir existant (Nakashiba et al., 2012; Yassa & Stark, 2011).

2.2. Anatomie de l'hippocampe

Au sens strict, le terme hippocampe désigne seulement la Corne d'Amon, une structure de l'archicortex subdivisée en 4 sous-régions de CA1 à CA4. Cependant, dans le langage courant l'hippocampe désigne également le Gyrus denté, une autre structure de l'archicortex avec laquelle la Corne d'Amon est imbriquée. L'hippocampe est lié fonctionnellement aux structures néocorticales adjacentes : le cortex entorhinal et le subiculum. On parle alors de formation hippocampique pour désigner l'ensemble de ces structures. Si l'hippocampe fait partie des structures cérébrales les plus étudiées, c'est également du fait de son anatomie particulière. Il forme un réseau de neurones très structuré dont les différentes zones sont aisément reconnaissables sur le plan morphologique et dont l'anatomie est corrélée avec l'aspect fonctionnel. La topographie de ce réseau est idéale pour étudier la neurotransmission par les techniques d'électrophysiologie par exemple.

2.2.1. Structure du réseau de neurones

L'hippocampe est composé en majorité de neurones de projection qui sont des neurones excitateurs glutamatergiques. Ils sont appelés « cellules pyramidales » ou « neurones pyramidaux » du fait de la forme triangulaire de leur corps cellulaire. L'hippocampe comporte aussi plusieurs types de neurones inhibiteurs GABAergiques. Ce sont des interneurones, ils font des synapses localement soit avec les neurones pyramidaux soit avec d'autres interneurones inhibiteurs. Dans le CA1, entre 80 et 90% des synapses sont glutamatergiques et les 10-20% restants sont GABAergiques (Di Maio, 2021).

Le réseau de neurone dans l'hippocampe est structuré de telle sorte que l'essentiel de l'information circule de manière unidirectionnelle. Les fibres excitatrices venant des couches II et III du cortex entorhinal constituent la principale afférence de l'hippocampe, il s'agit de la voie perforante. Ces fibres contactent les cellules granulaires du gyrus denté. Les axones des neurones du Gyrus denté contactent les cellules pyramidales du CA3, il s'agit des fibres moussues (Swanson et al., 1978). Ces cellules contactent à leur tour les neurones pyramidaux du CA1 par l'intermédiaire des collatérales de Schaeffer. Enfin, les axones des cellules excitatrices du CA1 contactent le subiculum. Ce circuit tri-synaptique est le principal circuit de transmission dans l'hippocampe mais il y a d'autres connexions. Par exemple, la voie perforante arrivant du cortex entorhinal contacte également directement le CA3 et même le CA1. Certaines fibres issues du CA3 font synapse au niveau du CA2 dont les neurones projettent ensuite vers le CA1 mais aussi vers le CA3 et le cortex entorhinal (Rowland et al., 2013). Le CA1 et le subiculum ont également des projections rétrogrades vers le cortex entorhinal (Andersen et al., 2006).

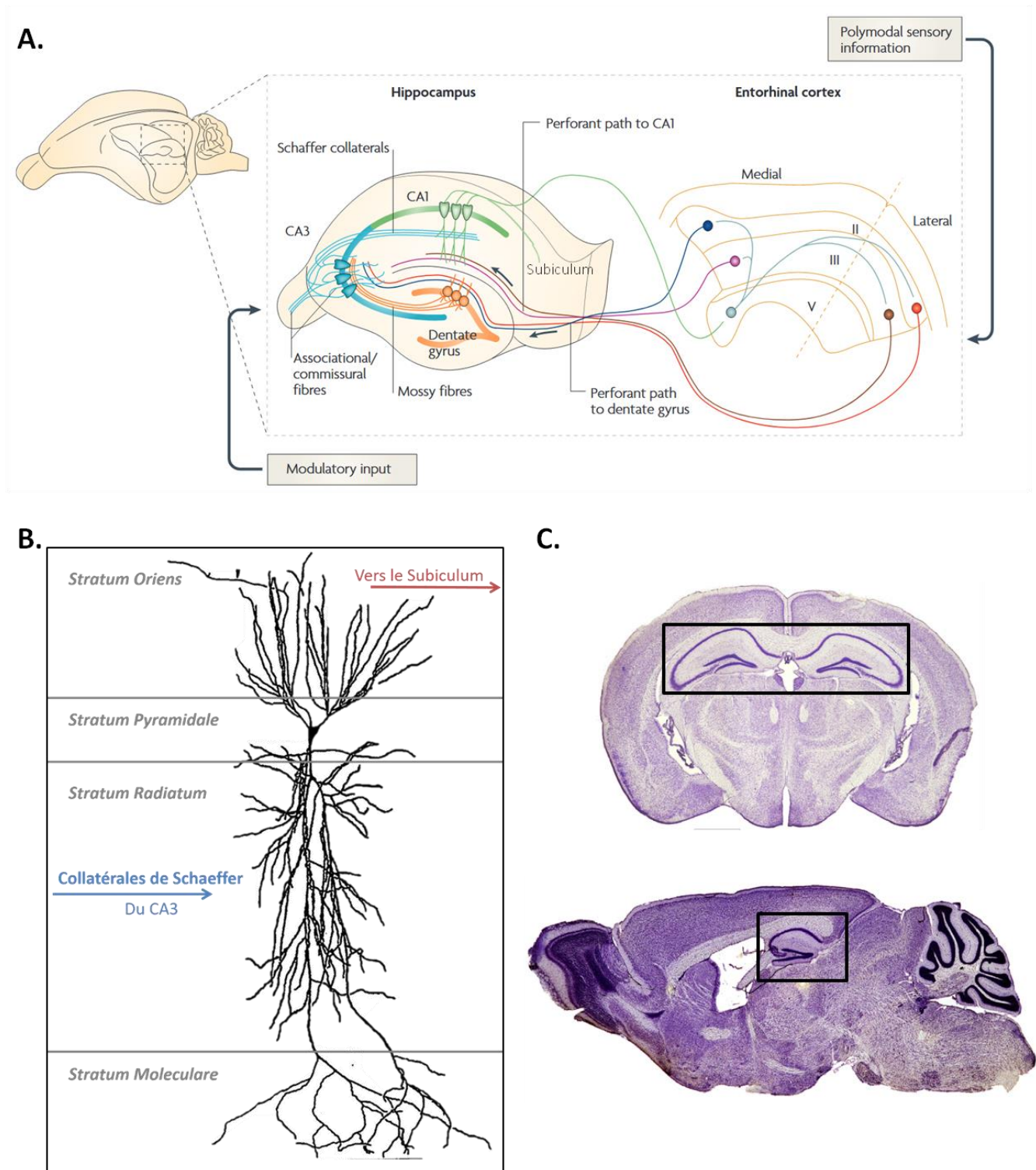


Figure 2 : Anatomie de l'hippocampe. **A.** Représentation schématique d'une coupe d'hippocampe et des principales connexions du réseau. Adapté d'après Neves et al. 2008. **B.** Dessin de la morphologie d'un neurone pyramidal du CA1. **C.** Coupe coronale (haut) et sagittale (bas) d'un cerveau de souris. L'hippocampe est visible dans l'encadré. Adapté d'après Franklin & Paxinos, 2019.

2.2.2. Organisation laminaire du CA1

L'hippocampe étant une structure de l'archicortex, il est organisé en 4 couches distinctes. Bien que chaque sous-structure ait ses spécificités anatomiques, l'ensemble de la corne d'Amon et du gyrus denté a cette organisation laminaire. Je vais ici brièvement décrire ces couches en prenant pour référence le CA1, où se trouvent les synapses que j'ai étudiées au cours de ma thèse : les synapses entre les collatérales de Schaeffer et les neurones pyramidaux qui projettent vers le subiculum.

Les cellules pyramidales sont toutes alignées et leur corps cellulaire se trouve dans le *stratum pyramidale*. Ces cellules forment de longues dendrites qui descendent, parallèles les unes aux autres, dans la couche du dessous appelée *stratum radiatum*. C'est dans cette couche que passent, perpendiculairement aux dendrites, les axones des neurones du CA3 : les collatérales de Schaeffer. C'est également dans cette couche que sont présents la majorité des interneurons GABAergique qui modulent la transmission des cellules principales. Sous le *stratum radiatum* se trouve le *stratum moleculare*, dans lequel passent les fibres de la voie perforante arrivant du cortex entorhinal. Enfin, on retrouve à l'opposé le *stratum oriens*, situé au-dessus des corps cellulaires des neurones pyramidaux. Cette couche comporte des corps cellulaires d'interneurones et on y retrouve principalement les dendrites des cellules pyramidales ainsi que leurs axones qui projettent en direction du subiculum (Andersen et al., 2006; Neves et al., 2008).

Dans le *stratum radiatum*, les collatérales de Schaeffer font principalement des synapses « en passant » avec les neurones pyramidaux du CA1 (Sorra & Harris, 1993). Au niveau postsynaptique, les dendrites forment des protrusions appelées épines dendritiques. Celles-ci sont caractéristiques des synapses excitatrices car les axones des interneurons inhibiteurs font des synapses majoritairement au niveau de l'arborisation dendritique (Tao et al., 2018).

La structure du réseau hippocampique est propice à l'étude de la plasticité synaptique. Les synapses présentes dans le *stratum radiatum* du CA1 sont soumises à plusieurs mécanismes de plasticité synaptique impliqués dans la formation de la mémoire.

2.3. Plasticité synaptique dans l'hippocampe

La plasticité synaptique décrit une modification ponctuelle de la capacité de transmission d'une ou d'un ensemble de synapses, par l'activité synaptique elle-même. Cette modification peut être plus ou moins prolongée dans le temps. Toutes les synapses du cerveau peuvent potentiellement exprimer une plasticité synaptique et celle-ci peut prendre de très nombreuses formes. Elle peut impliquer des changements au niveau moléculaire, des régulations transcriptionnelles et même des modifications morphologiques. Elle peut avoir pour effet soit d'augmenter la capacité de transmission, on parle de

potentialisation, soit de la diminuer, on parle alors de dépression. Ces changements, en fonction du type de plasticité, s'étalent sur des durées de temps très variables allant de quelques millisecondes à plusieurs jours (Citri & Malenka, 2008). Il y a un consensus dans la littérature pour discriminer les formes de plasticité à court terme, qui modifient la transmission synaptique sur des périodes de quelques millisecondes à quelques minutes et les formes de plasticité à long terme qui durent plusieurs heures.

Dans le paradigme actuel, la plasticité synaptique serait le mécanisme qui rendrait possible les apprentissages et qui serait le siège de la mémoire. La plasticité synaptique à long terme permettrait au cerveau de garder une trace persistante (mémoire à long terme) d'une expérience transitoire (Morris, 2003). La plasticité à court terme permettrait le stockage temporaire d'informations et aurait un rôle clé dans le contrôle des mouvements, l'élaboration de la parole ou le traitement des informations sensorielles (McGettigan et al., 2011; Mongillo et al., 2008; Wu et al., 2013).

2.3.1. Plasticité à court terme

La plasticité à court terme des synapses est un mécanisme qui permet d'enrichir la dynamique du réseau, en lui permettant par exemple de réaliser un filtrage temporel de la transmission ou de générer une rythmicité de la transmission (Wu et al., 2013). Au contraire de la plasticité à long terme, elle n'est pas dépendante de la synthèse de nouvelles protéines ou de modifications morphologiques. Les mécanismes responsables de son induction ont lieu principalement au niveau du compartiment présynaptique.

2.3.1.1. Probabilité de libération des neurotransmetteurs

Au niveau de la terminaison présynaptique, la libération de neurotransmetteurs se fait suite à l'arrivée d'un PA. Certaines vésicules de neurotransmetteurs sont arrimées à la membrane, leurs complexes protéiques v-SNARE sont appariés aux complexes t-SNARE de la membrane plasmique. Ces vésicules constituent le pool de vésicules immédiatement libérables (Kaesler & Regehr, 2017). Le PA provoque l'activation de canaux calciques voltage-dépendants (CCVD) et une entrée de Ca^{2+} . Ce calcium, détecté par des senseurs calciques au niveau du complexe d'arrimage, est nécessaire pour initier l'exocytose des vésicules arrimées. L'exocytose n'est pas systématique suite à l'arrivée d'un PA. Les synapses ont une probabilité de libération qui est inférieure à 1 et qui est très variable d'un type de synapses à l'autre et même entre synapses du même type (Dobrunz & Stevens, 1997). Elle est en moyenne de 0,2 à 0,3 pour les synapses glutamatergiques de l'hippocampe (Dobrunz, 2002). La probabilité de libération est déterminée par l'organisation spatiale du pool de vésicules

immédiatement libérables et des CCVD ainsi que par la concentration du calcium, des tampons calciques et des senseurs calciques, leur taux de liaison et de diffusion (Nadkarni et al., 2012).

La probabilité de libération initiale est corrélée à la taille du pool de vésicules immédiatement libérable. Plus ce pool est grand, plus la probabilité de libération est élevée. De plus, la probabilité de libération d'une synapse donnée diminue au fur et à mesure de la diminution de son pool (Dobrunz, 2002).

2.3.1.2. « Paired-Pulse Facilitation » et « Paired-Pulse Depression »

La plasticité à court terme peut s'exprimer lorsqu'une fibre présynaptique est activée à plusieurs reprises dans un intervalle de temps très court, allant de quelques millisecondes à quelques centaines de millisecondes (Dobrunz & Stevens, 1997). Dans ce cas, la réponse synaptique à la deuxième activation peut être soit augmentée soit diminuée par rapport à la première. En électrophysiologie, ce phénomène est étudié en réalisant une paire de stimulations de même intensité dans un intervalle de temps court (généralement 10 à 200ms selon le protocole). On parle de « Paired-Pulse Facilitation » ou PPF lorsque la deuxième réponse évoquée est plus grande que la première (le ratio du second pulse sur le premier (PPR pour « paired-pulse ratio ») est supérieur à 1). Si au contraire, la réponse à la deuxième stimulation est plus petite que la première ($PPR < 1$), il y a une « Paired-Pulse Depression » ou PPD.

La PPF est très fréquente lorsque l'intervalle inter-stimulus est compris entre 20ms et 200ms. Lorsqu'une population de synapses est stimulée, la PPF peut induire une seconde réponse jusqu'à 5 fois supérieure à la première mais le PPR est généralement compris entre 1,5 et 2. L'explication communément admise pour ce phénomène est celle du calcium résiduel dans la terminaison synaptique. Au moment du second pulse, il reste du calcium de la première activation. Celui-ci s'accumule donc au moment de l'arrivée du deuxième PA, augmentant ainsi la probabilité de libération de vésicules de neurotransmetteurs. Au vu de l'efficacité des mécanismes permettant l'évacuation du calcium après un PA, la quantité de calcium résiduel au moment du deuxième PA peut sembler insuffisante à justifier une telle différence (Felmy et al., 2003; Helmchen et al., 1997). Cependant, il est possible que le calcium entré lors du premier pulse sature les tampons calciques situés dans une zone clé, entre les sites d'entrée du calcium et d'exocytose. Cela rendrait la deuxième entrée de calcium plus efficace pour induire la fusion de la vésicule synaptique à la membrane (Catterall & Few, 2008).

L'ampleur de la facilitation dépend de la probabilité de libération initiale. La facilitation sera d'autant plus importante que la probabilité de libération initiale était faible (Dobrunz & Stevens, 1997). De fait, une modulation qui diminue la probabilité de libération peut causer une augmentation de la

PPF ou faire passer la synapse d'un état de PPD à un état de PPF. La modulation que subit une synapse influence donc sa plasticité.

La PPD est couramment observée lorsque l'intervalle inter-stimulus est très faible (inférieur à 20ms) ou pour des synapses ayant une probabilité de libération initiale très élevée. Elle pourrait résulter d'une période d'inactivation des canaux sodiques ou calciques dépendants du voltage. Une autre hypothèse expliquant la PPD est l'inhibition « feedforward » par les interneurons qui activent les récepteurs GABAergiques au niveau pré et postsynaptique (Leung et al., 2008).

Note : Comme c'est le cas dans les études présentées dans cette thèse, l'induction de PPF par un protocole de stimulation paillée peut être utilisée comme un outil permettant d'évaluer la probabilité de libération. En effet, comme il existe une relation entre la probabilité de libération initiale d'une synapse et la facilitation observée au second pulse (Dobrunz & Stevens, 1997), le ratio entre les deux pulses peut donner une indication sur la probabilité de libération. Lors du second pulse, le calcium résiduel fait que la probabilité de libération de la synapse est théoriquement proche de 1. Ainsi, plus la différence entre les deux réponses est grande (PPR élevé), plus la probabilité de libération initiale était faible. Au contraire, si les deux réponses sont similaires (PPR faible) on peut en conclure que la probabilité de libération initiale était déjà élevée. Cette méthode ne donne pas de valeur absolue de la probabilité de libération. En revanche, elle permet de détecter son augmentation ou sa diminution au cours du temps.

2.3.1.3. Plasticité induite par stimulations répétées

Potentialisation post-tétanique

La potentialisation Post-tétanique est une forme de plasticité pouvant durer de quelques dizaines de secondes à quelques minutes et qui intervient à la suite d'une activité présynaptique à haute fréquence, induite par une stimulation tétanique (Zucker & Regehr, 2002). Ce phénomène, comme la PPF, serait dû à une accumulation de calcium dans le compartiment présynaptique. Lors de la stimulation tétanique, le calcium présent en trop grande quantité serait stocké temporairement dans la mitochondrie qui le libère progressivement par la suite (Tang & Zucker, 1997). De plus, l'efflux calcique serait diminué à cause de l'accumulation de sodium qui réduit l'efficacité des pompes $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ce qui contribuerait à son accumulation (Mulkey & Zucker, 1992).

Dépression synaptique

Une stimulation répétée à une fréquence élevée peut aussi induire une dépression synaptique. Cela serait dû à une déplétion du pool de vésicules prêtes à être libérées au niveau de la terminaison

présynaptique. Ce pool est en moyenne de 5 ± 3 vésicules dans l'hippocampe (Dobrunz & Stevens, 1997). La dépression synaptique concerne en premier lieu les synapses ayant une probabilité de libération élevée. L'arrivée de PA à haute fréquence sature les mécanismes qui permettent la récupération de la machinerie présynaptique et le remplissage des vésicules. Le pool de vésicules prêtes à être libérées diminue progressivement jusqu'à être épuisé (Rosenmund & Stevens, 1996). Un autre mécanisme à prendre en compte pour expliquer la dépression synaptique est la diminution de l'entrée de Ca^{2+} due à l'inactivation des canaux Ca^{2+} (Xu & Wu, 2005).

Bien que la plasticité à court terme soit principalement en lien avec des mécanismes présynaptiques, certains mécanismes postsynaptiques peuvent également être impliqués. On peut par exemple observer une désensibilisation des RAMPs postsynaptiques dans certaines conditions (Brenowitz & Trussell, 2001). En effet, lors d'une activation prolongée, ils passent dans un état inactivé et leur canal ionique est fermé malgré la présence du ligand.

Plasticité biphasique

Pendant un train de PA, certaines synapses peuvent être d'abord facilitées puis déprimées. Ce phénomène est appelé plasticité biphasique à court terme (Savanthrapadian et al., 2014). C'est le cas de certains interneurons GABAergiques de l'hippocampe (Savanthrapadian et al., 2014). Cette forme de plasticité peut s'expliquer par la combinaison dynamique de différents mécanismes mentionnés ci-dessus.

Pour conclure, les différents mécanismes décrits sont tous susceptibles de se produire lorsque les neurones déchargent plusieurs fois dans un intervalle de temps restreint. L'état physiologique de la synapse va déterminer quel mécanisme prend le pas sur les autres. Les synapses présentant une probabilité de libération initiale faible peuvent généralement être potentialisées alors que les synapses dont la probabilité de libération initiale est déjà élevée seront plus facilement déprimées.

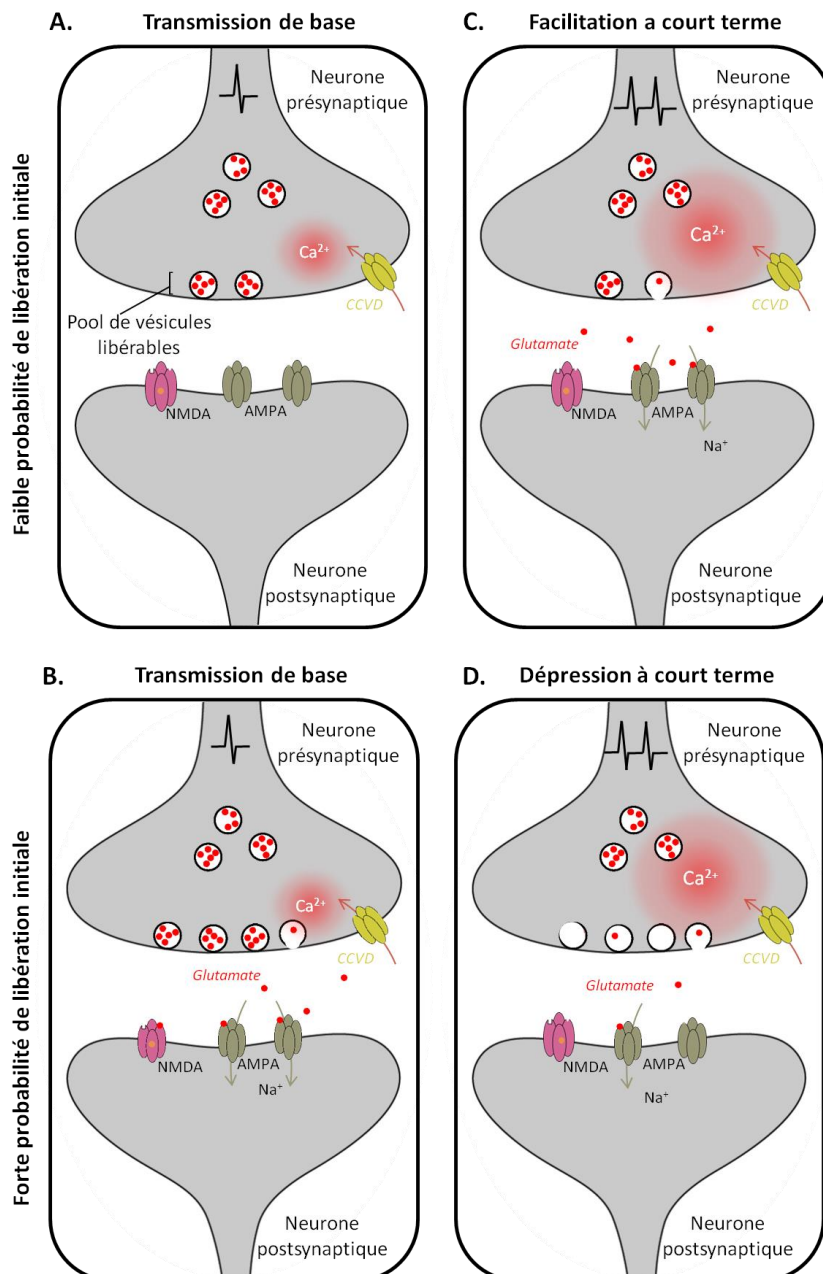


Figure 3 : Schémas simplifiés des principaux mécanismes intracellulaires conduisant à l'induction de la facilitation et de la dépression à court terme. A. et B. L'arrivée d'un PA peut déclencher ou non la libération de neurotransmetteurs. La probabilité de libération est en lien avec la taille du pool de vésicules libérables. C. L'arrivée d'un second pulse dans un intervalle de temps court provoque une accumulation de calcium au niveau du terminal présynaptique. Cela peut augmenter la probabilité de libération et induire une facilitation à court terme. D. La répétition des stimulations peut induire une déplétion du pool de vésicules libérables et provoquer une dépression à court terme aux synapses ayant une probabilité de libération élevée.

2.3.2. Plasticité à long terme

La plasticité synaptique à long terme est un changement persistant de la capacité de transmission d'une synapse dépendant de l'activité (Citri & Malenka, 2008). On distingue la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD). Ces formes de plasticité concernent aussi bien les synapses excitatrices qu'inhibitrices et mettent principalement en jeu des mécanismes postsynaptiques.

La plasticité à long terme est considérée comme étant le corrélat cellulaire de la mémoire et a fait l'objet d'un nombre d'études important. Je vais décrire ici la LTP et LTD « classique » qui mettent en jeu des mécanismes postsynaptiques dépendants de l'activation des récepteurs NMDA (RNMDA) (Malenka & Nicoll, 1993). Il faut cependant garder à l'esprit que d'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer la plasticité à long terme et qu'il existe d'autres formes de LTP et LTD indépendantes des RNMDA faisant intervenir des mécanismes pré et postsynaptiques (Nicoll & Schmitz, 2005).

2.3.2.1. LTP

La LTP est un renforcement persistant de la transmission synaptique qui a été découverte dans les années 1970 (Bliss & Lomo, 1973). Elle comporte plusieurs phases : l'induction, l'expression et la maintenance.

Induction de la LTP

En plus du RAMPA, les neurones postsynaptiques des synapses glutamatergiques expriment un autre type de récepteur canal : le RNMDA. Ce récepteur, également activé par le glutamate, a la particularité de ne pas participer à la transmission synaptique de base (Collingridge et al., 1983). Il présente deux propriétés clés qui le distinguent des autres récepteurs canaux : (1) son activation nécessite la liaison sur un autre site d'un co-agoniste, la D-serine ou la glycine. (2) Au potentiel de repos, le pore du récepteur est bouché par la présence d'un ion Mg^{2+} , bloquant le passage de tous les autres ions. Une dépolarisation est nécessaire pour que le bouchon de magnésium soit expulsé du pore et que les cations puissent passer (Reynolds, 1990; Vyklicky et al., 2014). Ces propriétés font du RNMDA un détecteur de la concomitance de l'activité présynaptique, astrocytaire et postsynaptique. En effet, le RNMDA ne s'active que lorsque du glutamate (présynaptique) et de la D-sérine (astrocytaire) sont présents dans l'espace extracellulaire et que le neurone postsynaptique est dépolarisé. Cette notion de simultanéité de l'activité pré et postsynaptique est à la base de la plasticité hebbienne, définie d'après le postulat de Donald Hebb. Ce psychologue a proposé que la synchronie de l'activité de deux neurones renforçait leur connexion et serait une des bases de la mémoire (Hebb).

Contrairement au RAMPA classiques le pore du RNMDA est perméable au Ca^{2+} . L'entrée de calcium module différents effecteurs intracellulaires et provoque des changements à long terme. Les RNMDA ont également une cinétique beaucoup plus lente que les AMPAR. Après la libération de glutamate, les RNMDA s'ouvrent et se referment plus lentement. Ils peuvent rester ouverts pendant plusieurs centaines de millisecondes après la libération présynaptique de glutamate, soit beaucoup plus longtemps que les RAMPA qui ne s'ouvrent généralement que pendant quelques millisecondes.

Protocoles d'induction

En électrophysiologie *in vitro*, il existe plusieurs protocoles d'induction de la LTP. Le plus utilisé consiste en une ou plusieurs stimulations téaniques. Il s'agit d'appliquer un ou plusieurs trains de brefs pulses de courant à une fréquence de 100Hz durant une seconde, au niveau des fibres présynaptiques. Dans le cas d'une stimulation des synapses CA3-CA1, cette action se passe donc dans les collatérales de Schaeffer. Ces 100 stimulations répétées à haute fréquence ont pour effet d'induire la libération de beaucoup de transmetteurs et de créer une forte dépolarisation des neurones postsynaptiques. Cela active les récepteurs NMDA et provoquer une entrée de calcium.

L'une des alternatives à la stimulation téanique est la stimulation par burst de rythme thêta (TBS pour « Theta burst stimulation ») (Larson et al., 1986). Ce protocole consiste en de courts trains de 5 stimulations à 100Hz répétées plusieurs fois (généralement 10 fois) à un intervalle de 200ms. Cette stimulation est réputée plus physiologique car elle mime les burst de décharge qui existent *in vivo* dans l'hippocampe et qui sont calés sur un rythme d'activité naturelle de l'hippocampe (Larson & Munkácsy, 2015).

Une autre méthode existante est le protocole d'appariement. Elle nécessite de pouvoir contrôler le potentiel de membrane du neurone postsynaptique par la technique de patch clamp. En injectant du courant par l'intermédiaire de l'électrode de patch, la membrane de la cellule postsynaptique est maintenue dépolarisée pendant que les fibres présynaptiques sont stimulées à une basse fréquence (1Hz).

Expression de la LTP

Une fois les RNMDA ouverts, l'afflux de Ca^{2+} active des effecteurs intracellulaires et provoque des changements durables au niveau du terminal postsynaptique. On distingue deux phases dans l'expression de la LTP : la phase précoce et la phase tardive.

La phase précoce consiste en l'insertion de nouveaux RAMPA dans la zone active de la synapse (Baltaci et al., 2019; Shi et al., 1999). Ce phénomène est dépendant de l'activation de protéines kinases,

notamment la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante II (CaMKII) qui est l'effecteur clé de l'induction de la LTP (Hayashi et al., 2000; Lee et al., 2009). La liaison du Ca^{2+} à cette protéine conduit à son activation par autophosphorylation. La CaMKII activée phosphoryle différents effecteurs postsynaptiques. Par exemple, on peut noter l'implication de la protéine kinase A (PKA) (Esteban et al., 2003) ou de la protéine kinase (PKC) (Boehm et al., 2006). L'activité CaMKII conduit finalement à l'augmentation du nombre de récepteurs dans la zone active de la synapse. Cette augmentation peut être due à deux mécanismes. Le premier est la mobilisation par phosphorylation des RAMPs contenant la sous-unité GluR1. En conditions basales, ces récepteurs sont présents à la membrane plasmique mais exclus de la zone active de la synapse (Hayashi et al., 2000; Lee et al., 2003). Le second mécanisme est l'exocytose de vésicules postsynaptiques contenant de nouveaux RAMPs (Makino & Malinow, 2009).

S'il y a eu une répétition des stimuli à haute fréquence pour l'induction de la LTP, celle-ci peut se prolonger sur une très longue durée (jusqu'à 24h ou plus). Après plusieurs heures, on entre dans la phase tardive de la LTP et de nouveaux mécanismes impliquant des changements dans l'expression de gènes et dans la synthèse de protéines entrent en jeu (Nguyen et al., 1994). Cette phase requiert notamment la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui est favorisée par l'interaction de la CaMKII avec l'adénylate cyclase, ainsi que l'activation de la PKA. L'AMPC et la PKA permettent l'activation du facteur de transcription CREB qui va moduler l'expression de gènes. Cependant, d'autres voies de signalisation sont aussi impliquées comme celle des « Mitogen-activated protein kinases » (MAPK) par exemple. (Baltaci et al., 2019).

2.3.2.2. LTD

Induction de la LTD

L'induction de la LTD dépend aussi d'un influx calcique consécutif à l'activation des RNMDA. Le même récepteur serait donc responsable de deux mécanismes opposés. C'est son niveau d'activation qui serait le facteur déterminant. En effet, il semble qu'une activation modeste des RNMDA et une faible entrée de calcium soit optimale pour déclencher la LTD, alors qu'une activation plus forte des RNMDA conduisant à des entrées plus importantes du calcium déclenche la LTP (Malenka, 1994).

En fait, le blocage des RNMDA par le Mg^{2+} est incomplet même au potentiel de repos (Jahr & Stevens, 1993). Du Ca^{2+} entre donc dans la cellule pendant la stimulation synaptique à basse fréquence (Bloodgood & Sabatini, 2007). Ce serait l'occurrence répétée de cet influx de Ca^{2+} dépendant des RNMDA qui déclencherait l'induction de la LTD.

Expression de la LTD

Contrairement à la LTP, l'expression de la LTD se caractérise par l'internalisation de RAMPa par endocytose (Wang & Linden, 2000). L'entrée de Ca^{2+} active la Calcineurine, une protéine qui va induire la déphosphorylation des sous unités GluR1 des RAMPa et promouvoir l'endocytose (Sanderson et al., 2016). C'est la quantité de calcium entrant de la cellule qui détermine l'activation de la voie de signalisation conduisant à la LTP ou à la LTD. En effet, les différentes protéines effectrices impliquées ont des affinités différentes pour le calcium. Les effecteurs impliqués dans l'expression de la LTD, comme la calcineurine, ont une forte affinité pour le Ca^{2+} , ils sont actifs à une faible concentration. Ceux impliqués dans l'expression de la LTP, comme la CaMKII, ont une affinité pour le Ca^{2+} plus faible. Ils ont donc besoin d'une entrée de calcium plus conséquente pour être activés mais inhibent les effecteurs de la LTD (Lisman et al., 2002).

Les neurones sont des cellules hautement spécialisées qui ne fonctionnent pas de manière autonome dans le SNC. Ils sont dépendants des cellules gliales pour conserver leur homéostasie. Parmi les cellules gliales, les astrocytes remplissent plusieurs fonctions essentielles au maintien d'une communication synaptique normale. De plus, ces cellules sont capables de moduler activement la transmission synaptique.

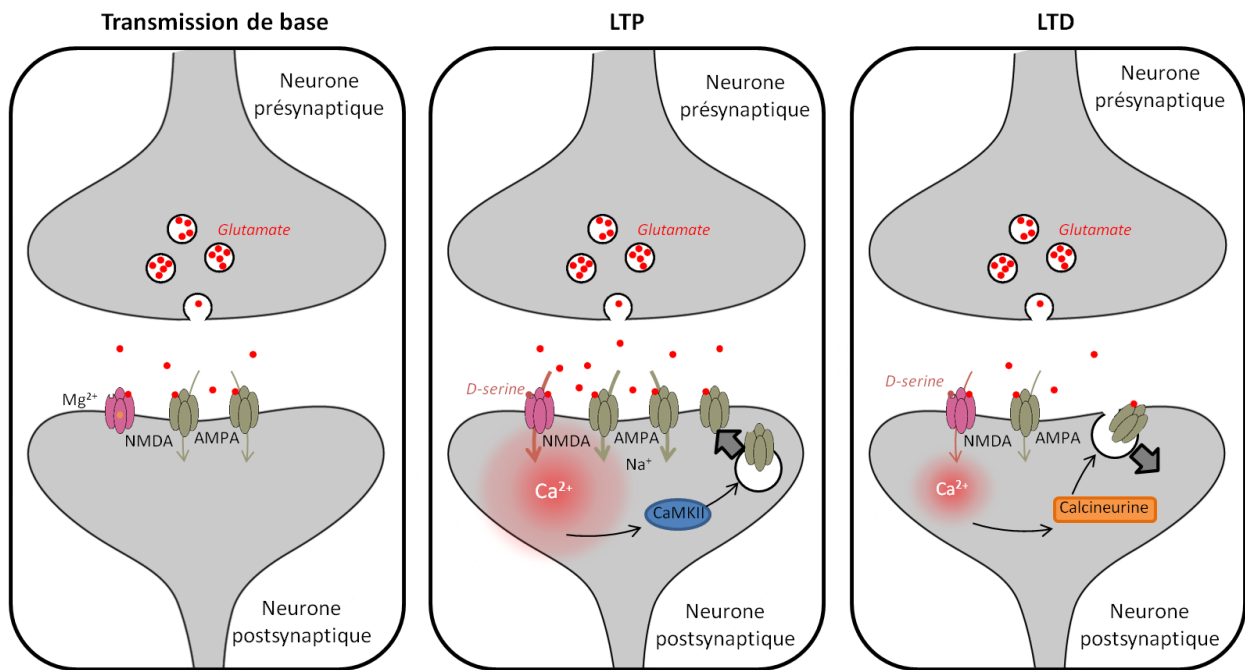


Figure 4 : Schémas simplifiés des mécanismes intracellulaires conduisant à l'induction de la LTP et de la LTD. A. Les RNMDA ne participent pas à la transmission synaptique de base car ils sont bloqués par les ions Mg^{2+} . B. L'activation des NMDA par une concomitance de l'activité pré et post synaptique induit une LTP. L'entrée de Ca^{2+} par le RNMDA permet l'activation de la CaMKII et la mobilisation de RAMPA. C. Une activité à basse fréquence peut induire une LTD. L'entrée répétée d'une petite quantité de Ca^{2+} par le RNMDA permet l'activation Calcineurine et la démobilité de RAMPA.

3. L'astrocyte, un partenaire des neurones au cours de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique à long terme

L'astrocyte, en tant qu'élément de la synapse tripartite, joue un rôle clé dans la modulation de la transmission synaptique. Dans cette partie, je vais présenter très brièvement les principaux types de cellules gliales avant de me concentrer sur l'astrocyte. Je présenterai ses principales caractéristiques et fonctions puis j'aborderai plus en détail son rôle dans la régulation de la transmission synaptique.

3.1. Les cellules gliales

Les cellules gliales représentent une population de cellules très hétérogènes. Elles ont été regroupées sous le terme de "glie" pour des raisons historiques, puisqu'il a longtemps été difficile de distinguer les différents types de cellules non électriquement excitables du SNC (Verkhratsky & Butt, 2013). Le nombre de cellules gliales et le ratio neurones/Glie dans le cerveau est difficile à déterminer et n'a pas toujours fait consensus. Selon les estimations actuelles, il y aurait entre 150 et 200 milliards de cellules dans le cerveau humain, avec un ratio glie neurone proche de 1 : 1 comme chez les autres mammifères (Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2014).

Les astrocytes

Les astrocytes représentent entre 20% et 40% des cellules non neuronales, soit environ 10-20% des cellules du SNC (Herculano-Houzel, 2014; Sun et al., 2017). Ces cellules sont composées d'un corps cellulaire, de 5 à 10 prolongements principaux et d'une multitude de ramifications de plus en plus fines. Les astrocytes sont essentiels au fonctionnement du cerveau. Ils sont en étroite interaction avec les vaisseaux et les neurones et jouent un rôle clé dans le couplage neurovasculaire et neurométabolique (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Les prolongements astrocytaires constituent, avec les terminaisons neuronales, la synapse tripartite. Ils recapturent les neurotransmetteurs après la transmission synaptique et servent de tampon ionique en régulant la concentration des ions autour du neurone. Ils sont également impliqués dans la régulation active de la transmission synaptique (Pاناتier & Robitaille, 2016). La synapse tripartite et le rôle des astrocytes dans la transmission seront détaillés dans les parties suivantes.

Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes ont pour fonction principale la formation d'une gaine de myéline autour des axones. Cette gaine lipidique isolante permet une conduction saltatoire des courants électriques. Cette conduction, moins énergivore et bien plus rapide, est essentielle pour une transmission de l'information efficace sur des distances importantes (Nave, 2010). Entre deux gaines de myéline, une

portion d'axone est laissée nue. Il s'agit du nœud de Ranvier, où se trouvent notamment les canaux voltage-dépendants nécessaires à la régénération du PA. Au sein d'une même structure, les axones ne sont généralement pas myélinisés mais la gaine de myéline est importante pour les neurones de projection, entre les structures ou entre les hémisphères.

Glie NG2

Les cellules gliales NG2, exprimant le protéoglycane NG2, n'ont été mises en évidence que dans les années 1980. Elles sont les précurseurs des oligodendrocytes. Cependant, il se pourrait que ces cellules encore mal connues jouent un rôle totalement différent à l'âge adulte. En effet, elles auraient la capacité de former des synapses avec les neurones, ce qui laisse à penser qu'elles auraient d'autres fonctions (Bergles et al., 2010).

La microglie

Les cellules microgliales représentent environ 10% des cellules du SNC. Elles sont d'origine mésodermale, contrairement aux autres cellules gliales qui sont issues du neuroépithélium. Ce sont les macrophages résidents et la principale forme de défense immunitaire active du SNC (Ransohoff & Cardona, 2010). En conditions basales, leurs prolongements très motiles sondent constamment l'environnement. Ces prolongements interagissent beaucoup avec les synapses et les corps cellulaires des neurones et pourraient jouer un rôle dans la régulation de la transmission synaptique (Li et al., 2012; Panatier & Robitaille, 2012). Lorsque la microglie détecte une altération de l'équilibre physiologique, en cas de lésion ou d'intrusion de pathogène par exemple, elle devient réactive. Les microglies réactives endossent le rôle de cellules immunitaires : elles se multiplient, secrètent des cytokines et peuvent se comporter comme des phagocytes qui éliminent les pathogènes et les cellules endommagées (Ransohoff & Cardona, 2010) . La microglie joue également plusieurs rôles importants au cours du développement, notamment dans la maturation du réseau en participant à la sélection des synapses (Kierdorf & Prinz, 2017).

3.2. Caractérisation de l'astrocyte

3.2.1. Caractéristiques morphologiques

Les astrocytes ont été classés en différents types, principalement selon leur morphologie et dans certains cas selon le rôle particulier qu'ils occupent au sein d'une structure. On distingue deux principaux types d'astrocytes : les astrocytes protoplasmiques présents dans la matière grise et les astrocytes fibreux dans la matière blanche. Les autres types d'astrocytes sont généralement cantonnés

à une zone du SNC, dans laquelle des contraintes spécifiques les ont poussés à développer une morphologie ou fonction particulière.

Astrocytes protoplasmiques

Ce sont les astrocytes qui sont notamment présents dans l'hippocampe. Ils se caractérisent par un petit soma d'environ 10µm de diamètre, auquel sont rattachés entre 5 et 10 prolongements principaux à l'âge adulte. De ces processus primaires émerge une arborisation très dense. Les nombreuses ramifications aboutissent sur des processus plutôt courts et très fins (environ 150nm de diamètre), l'ensemble donnant une morphologie spongieuse caractéristique (Bushong et al., 2002). Les prolongements astrocytaires sont en contact étroit avec les synapses et peuvent même les envelopper partiellement ou totalement (voir partie 3.4.1). Chaque astrocyte protoplasmique possède également au moins un processus spécialisé qui va interagir avec un vaisseau sanguin, appelé le pied astrocytaire (Kacem et al., 1998). Celui-ci joue un rôle dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique mais est aussi indispensable aux fonctions de l'astrocyte (voir partie 3.3.1). La morphologie des astrocytes dans l'hippocampe est variée et au sein même du CA1, on retrouve des astrocytes fusiformes, sphériques ou très allongés (Bushong et al., 2002; Nixdorf-Bergweiler et al., 1994).

Dans le neuropile, chaque astrocyte occupe un territoire qui lui est propre appelé domaine astrocytaire. Ils sont adjacents les uns aux autres et mutuellement exclusifs (Ogata & Kosaka, 2002). Le domaine astrocytaire est d'environ 20,000 à 80,000 µm³ et un astrocyte enveloppe jusqu'à 100 000 synapses au sein de son domaine (Bushong et al., 2002; Halassa & Haydon, 2010). Celles-ci n'appartiennent pas toutes au même neurone puisque dans l'hippocampe un astrocyte enveloppe des synapses appartenant à 14 neurones différents en moyenne (Refaeli et al., 2021).

Astrocytes fibreux

Dans la substance blanche, ces astrocytes ne rencontrent pas de synapses mais ils sont entourés de fibres de projection. Ainsi, leur rôle est différent de celui des astrocytes protoplasmiques. Leurs corps cellulaires sont alignés, formant une rangée entre les fibres neuronales. Leurs processus sont plus longs (mesurant jusqu'à 300µm) et moins ramifiés. Contrairement aux astrocytes protoplasmiques, ces astrocytes ne semblent pas avoir de domaines mutuellement exclusifs. Ils ont plusieurs terminaisons périvasculaires et leurs autres processus contactent les axones au niveau des nœuds de Ranvier (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

3.2.2. Identification des astrocytes

La forte hétérogénéité morphologique des astrocytes est couplée à une hétérogénéité moléculaire. Il est donc très compliqué de trouver des marqueurs astrocytaires fiables, à la fois ubiquitaires et spécifiques.

Le principal marqueur des astrocytes est la GFAP (« Glial fibrillary acidic protein »). Cette protéine est un filament intermédiaire du cytosquelette. Elle est surexprimée en cas de réactivité astrocytaire (Pekny et al., 1999), son niveau d'expression peut donc être utilisé comme un indicateur de la réactivité. L'expression de cette protéine a longtemps été considérée comme purement astrocytaire (Ludwin et al., 1976). Cependant, la GFAP est également exprimée par les tanocytes et la glie radiaire, cette dernière étant un précurseur des astrocytes. La glie radiaire est présente surtout durant le développement et n'est plus détectée dans l'hippocampe à l'âge adulte, mais certaines de ses cellules persistent près des ventricules (Gubert et al., 2009). La GFAP est généralement bien exprimée par les astrocytes en culture. En revanche, dans le cerveau son niveau d'expression est plus variable ce qui peut rendre sa détection aléatoire (Ogata & Kosaka, 2002; Walz & Lang, 1998). Le pourcentage d'astrocytes détectés positifs pour la GFAP (GFAP+) varie beaucoup selon la structure et les anticorps utilisés. Dans l'hippocampe, du moins chez le juvénile, le taux de détection est l'un des plus élevés avec près de 80% des astrocytes GFAP+ (Bushong et al., 2002). Les filaments de GFAP ne sont présents que dans les prolongements principaux de l'astrocyte. Le marquage GFAP ne permet pas de visualiser les fins processus astrocytaires et ne permet donc pas d'étudier la morphologie de la cellule (Reichenbach et al., 2010).

L'alternative courante à la GFAP est le marquage de la protéine S100 β . Il s'agit d'une glycoprotéine qui lie le calcium et joue le rôle de tampon calcique et de senseur calcique (Donato et al., 2013). Cette protéine est impliquée dans la signalisation calcique intracellulaire (Xiong et al., 2000). De plus, le S100 β pourrait être sécrété dans l'espace extracellulaire et jouer un rôle dans la signalisation (Donato et al., 2009). Cette protéine cytosolique a un bon niveau d'expression et permet de visualiser la morphologie de l'astrocyte. Le S100 β marque une plus grande population d'astrocytes que la GFAP (Savchenko et al., 2000) mais il n'est pas non plus ubiquitaire. De plus, cette protéine n'est pas spécifique des astrocytes puisqu'elle est également exprimée par la glie NG2.

Une autre alternative pour identifier les astrocytes est le marquage de la protéine SOX9. Il s'agit d'un facteur de transcription qui induit donc un marquage nucléaire. SOX9 est exprimé par les progéniteurs neuraux au cours du développement mais est quasiment spécifique des astrocytes dans le cerveau mature. En effet, il peut aussi être exprimé par les épendymocytes mais ceux-ci sont restreints aux contours des ventricules (Sun et al., 2017). D'ailleurs, il se pourrait que ce facteur de

transcription soit impliqué dans la différenciation des précurseurs en astrocytes (Vogel et al., 2020). L'expression SOX9 ne varie pas avec l'âge et il est surexprimé en cas de réactivité astrocytaire (Sun et al., 2017). Le marquage nucléaire SOX9 ne permet pas d'étudier la morphologie de l'astrocyte mais il facilite le comptage des cellules. Cela présente un avantage pour les techniques nécessitant une quantification.

D'autres protéines exprimées spécifiquement dans les astrocytes, comme le transporteur au glutamate GLT-1, les canaux potassiques voltage-dépendants de type « inward rectifier » 4.1 (Kir 4.1) ou les aquaporines 4, peuvent être utilisées comme marqueurs. Cependant, elles sont cantonnées à des sous-localisations spécifiques de la cellule et produisent donc des marquages ponctiformes qui rendent l'identification des astrocytes difficile (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

3.3. Fonction de l'astrocyte

3.3.1. Interactions avec les vaisseaux sanguins

La transmission synaptique est un mécanisme énergivore. Par exemple chez l'humain, le cerveau ne représente que 2% du poids du corps mais consomme pourtant environ 20% de l'oxygène et du glucose (Mergenthaler et al., 2013). Le cerveau contient peu de réserves et il est donc très dépendant des apports d'oxygène et de substrats énergétiques transmis par la circulation sanguine. En conséquence, il est crucial que celle-ci soit régulée en fonction de l'activité cérébrale. Dans les zones cérébrales actives, on observe en effet une augmentation du débit sanguin local. Ce phénomène est appelé couplage neurovasculaire.

De par leur position stratégique entre les vaisseaux sanguins et les neurones, les astrocytes jouent un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique et le couplage neurovasculaire. En effet, ils ont un processus spécialisé qui contacte les vaisseaux : le pied astrocytaire. Cette terminaison périvasculaire enveloppe les vaisseaux et est optimisée pour les échanges avec la circulation sanguine. Elle capte le glucose circulant (McAllister et al., 2001) et réalise des échanges ioniques et aqueux via les canaux Kir 4.1 et les aquaporines 4 (Simard et al., 2003). De plus, le pied astrocytaire libère différents facteurs qui modulent les cellules endothéliales (Kim & Shin, 2001 ; Zhang et al. 2000). Cela permet notamment aux astrocytes de réguler le flux sanguin en fonction de l'activité neuronale qu'ils détectent dans leur domaine. (Takano et al., 2006; Zonta et al., 2003).

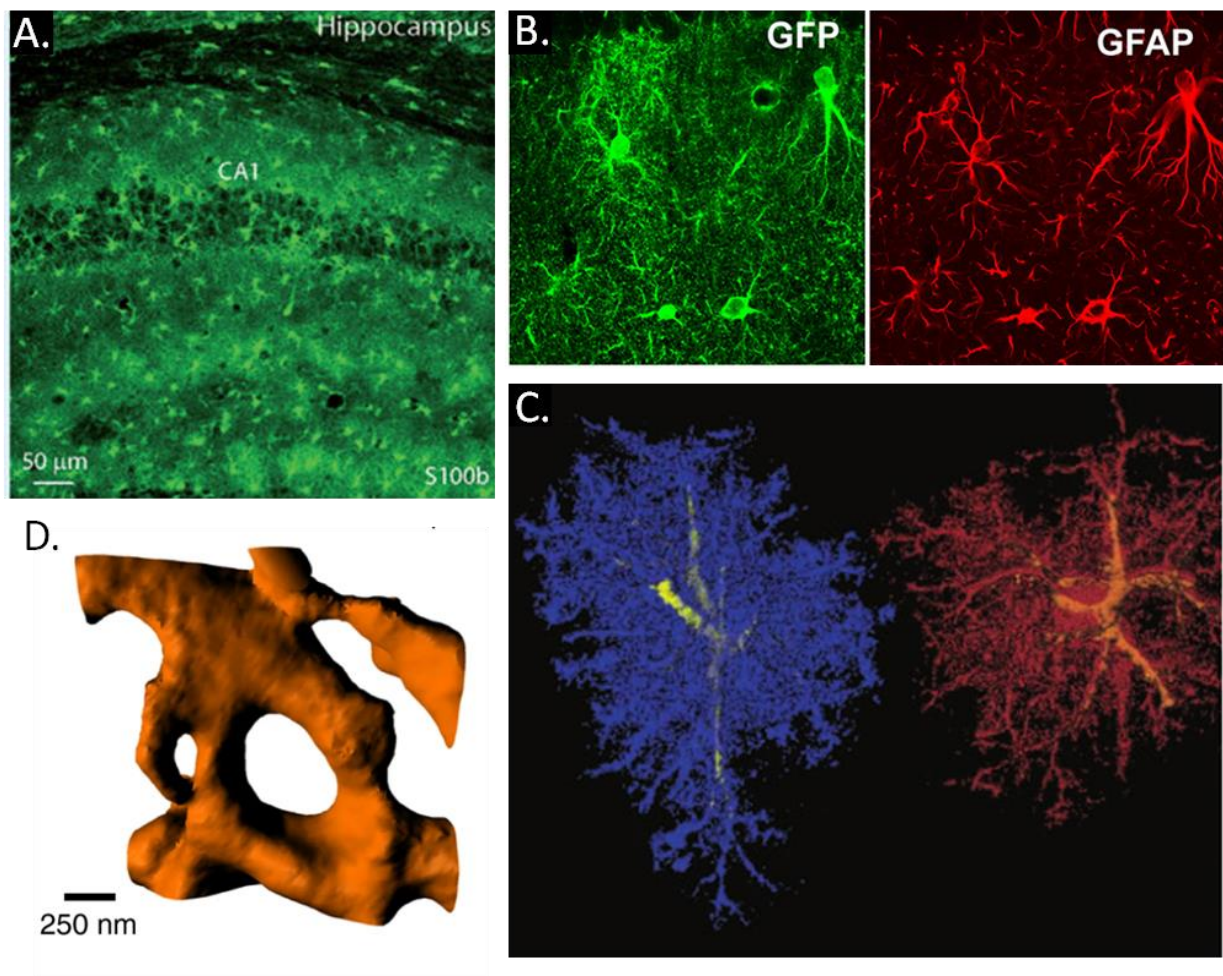


Figure 5 : Morphologie des astrocytes. **A.** Visualisation à l'aide d'un microscope confocal des astrocytes dans les différentes couches du CA1 de l'hippocampe. La protéine astrocytaire S100 β a été marquée par immunohistochimie. Image tirée de Ding, 2013. **B.** (En vert) Une injection de virus a permis l'expression d'une protéine cytosolique liée à la GFP sous le contrôle d'un promoteur astrocytaire. (En rouge) Marquage par immunohistochimie de la protéine astrocytaire GFAP sur la même tranche d'hippocampe. Image tirée de Szokol et al., 2015. **C.** Morphologie de deux astrocytes de l'hippocampe de rat déterminée par l'injection d'un colorant à l'aide d'une pipette de patch. Image tirée de Kimelberg, 2010. **D.** Reconstruction 3D de la morphologie spongiforme de fins processus astrocytaires à partir d'images de microscopie 2 photons. Image tirée de Arizono et al., 2020.

3.3.2. Support métabolique pour les neurones

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le cerveau consomme beaucoup d'énergie. Cela est principalement dû la demande énergétique élevée des neurones (Attwell & Laughlin, 2001). Pourtant, durant l'activité neuronale, la majorité du glucose de la circulation est captée par les astrocytes (Chuquet et al., 2010). Ce constat a fait naître le concept de la « navette du lactate astrocytaire » selon lequel les neurones seraient dépendants d'un apport énergétique par astrocyte sous forme de lactate pendant l'activité synaptique (Pellerin & Magistretti, 1994). En effet, lors de la transmission synaptique, la recapture du glutamate (voir partie 3.3.4) stimule la glycolyse et donc la production de lactate dans les astrocytes. Le lactate serait ensuite libéré par les transporteurs MCT1 et MCT4 astrocytaires (Pellerin & Magistretti, 1994) et récupéré par les neurones auxquels il sert de substrat énergétique pour la production d'Adénosine triphosphate (ATP) (Qu et al., 2000). Les transporteurs au lactate neuronaux et astrocytaires de l'hippocampe sont nécessaires à la formation de la mémoire, ce qui souligne l'importance de ce mécanisme dans le fonctionnement de la synapse (Netzahualcoyotzi & Pellerin, 2020).

3.3.3. Homéostasie de l'eau et des ions

Les astrocytes jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie ionique du milieu extracellulaire. En effet, les neurones provoquent d'importants flux ioniques au cours de la transmission synaptique et de la conduction axonale. Pour que l'ouverture des canaux neuronaux induisent toujours le même flux ionique et que la transmission reste efficace, il est crucial que les gradients ioniques soient maintenus.

La transmission synaptique conduit par exemple à l'accumulation de potassium dans l'espace extracellulaire (Ransom et al., 2000; Rice & Nicholson, 1990). Les astrocytes ont un rôle de tampon spatial du potassium en le recapturant rapidement via les canaux potassiques Kir 4.1 (Djukic et al., 2007; Kucheryavykh et al., 2007) et en le redistribuant par l'intermédiaire du syncytium astrocytaire (Kofuji & Newman, 2004). L'astrocyte est également impliqué dans la régulation des concentrations extracellulaires des autres ions, notamment les ions calcium (Zanotti & Charles, 1997) et les ions chlorure qui sont libérés par les neurones suite à l'activation des récepteurs GABAergiques ionotropiques (Egawa et al., 2013; Kettenmann et al., 1987).

3.3.4. Recapture du glutamate

La recapture du glutamate est un rôle clé des astrocytes. En effet, lors de l'activité neuronale, il est indispensable que le glutamate soit efficacement éliminé pour prévenir des phénomènes

d'excitotoxicité ainsi que pour garantir l'efficacité et la spécificité de la transmission en limitant sa diffusion spatiale.

Les astrocytes expriment deux types de transporteurs au glutamate : Le GLAST1 (pour « Glutamate-aspartate transporter 1 ») et le GLT-1 (pour « Glutamate transporter 1 ») qui selon la nomenclature peuvent aussi être désignés EAAT1 et EAAT2 respectivement (Pines et al., 1992; Storck et al., 1992). L'expression relative des deux types de transporteurs est variable selon type d'astrocyte et la structure. Dans le cas de l'hippocampe, les GLT-1 sont fortement exprimés alors qu'il y a peu de GLAST (Chaudhry et al., 1995). L'expression du transporteur peut en outre varier en fonction de l'activité neuronale. Par exemple, une baisse de l'activité entraîne une diminution de l'expression des transporteurs (Benediktsson et al., 2012).

La régulation des taux de glutamate se fait par le cycle glutamate – glutamine ou « Glutamate shuttle ». Les astrocytes sont responsables de la recapture de plus de 80% du glutamate extracellulaire (Danbolt, 2001). Une fois capté, le glutamate est converti en glutamine dans la cellule. Celle-ci est libérée dans l'espace extracellulaire à destination des neurones qui l'utilisent pour reconstituer leurs stocks de glutamate (Todd et al., 2017; Uwechue et al., 2012).

3.3.5. Réseaux

3.3.5.1. Jonctions communicantes

Les astrocytes ont la particularité de pouvoir mettre en communication leur cytoplasme à l'aide de jonctions communicantes ou jonctions GAP. Ces jonctions sont composées de connexines des protéines à 4 domaines transmembranaires. Elles sont agencées en connexon, qui correspond à un regroupement de 6 connexines formant un pore. Au niveau des jonctions GAP, l'espace extracellulaire est réduit à 2-3nm et les connexons des deux cellules s'alignent. Chaque jonction GAP contient des centaines de connexons. Les paires de connexons mettent en relation le cytoplasme des deux cellules en formant un pore d'environ 10Å laissant passer les molécules cytoplasmiques d'une taille inférieure à 1000Da. C'est à dire les ions mais également du glucose, des nucléotides et différents effecteurs intracellulaires. Il existe de nombreux types de connexines codés par différents gènes, ce qui conduit fréquemment à la construction de jonction GAP hétérotypique. Plusieurs d'entre elles peuvent être exprimées en dehors des jonctions GAP, elles forment alors un hémicanal. Ce canal qui communique avec l'espace extracellulaire serait impliqué dans la recapture et la libération de molécules et pourrait jouer un rôle dans la gliotransmission (Thompson & Macvicar, 2008) (voir partie 3.4.4).

3.3.5.2. Syncytium astrocytaire

Les astrocytes sont fortement couplés entre eux et forment ainsi un réseau parfois décrit comme le syncytium astrocytaire. Le nombre moyen de jonctions GAP entre deux astrocytes adjacents est supérieur à 200. Les astrocytes peuvent même être couplés à d'autres types de cellules gliales comme les oligodendrocytes (Griemsmann et al., 2015).

Ces observations ont conduit à l'hypothèse d'un grand syncytium panglial, qui connecterait l'ensemble de la macroglie à l'échelle du cerveau. Cette vision n'est plus vraiment d'actualité puisque les connexions avec d'autres types de cellules gliales semblent plutôt rares. De plus, tous les astrocytes voisins ne sont pas couplés de manière systématique. En effet dans l'hippocampe, la probabilité que deux astrocytes voisins soient couplés n'est que de 80% environ (Meme et al., 2009). Il se pourrait alors que les astrocytes forment des syncytia plus ou moins restreints selon la structure, qui correspondraient à des unités fonctionnelles à l'échelle du réseau. C'est par exemple le cas au niveau des barrels du cortex somato-sensoriel ou des amas glomérulaires du bulbe olfactif (Houades et al., 2008; Roux et al., 2011).

3.4. Synapse tripartite et gliotransmission

Le rôle de l'astrocyte dans le maintien de l'homéostasie est étudié depuis plus d'un siècle. En revanche, la contribution de ces cellules électriquement passives dans la transmission synaptique n'a été envisagée que relativement récemment. De nombreuses études réalisées entre les années 1980 et 1990 démontrent que les astrocytes possèdent des récepteurs qui leur permettent de détecter les principaux neurotransmetteurs du système nerveux (Bowman & Kimelberg, 1984; Glaum et al., 1990). Quelques années plus tard, on découvre que l'activation de ces récepteurs produit une excitation qui est encodée chimiquement par des flux de calcium intracellulaires, pouvant se traduire par la libération de transmetteurs gliaux (Bezzi et al., 1998; Pasti et al., 1997). Ces études ont placé les astrocytes au centre de l'attention et ont abouti à la naissance du concept de synapse tripartite, définissant l'astrocyte comme un élément à part entière de la synapse, au même titre que les éléments neuronaux pré et postsynaptiques (Araque et al., 1999).

3.4.1. Processus astrocytaires pérисynaptiques

Les fins prolongements en apposition directe avec les synapses sont appelés processus astrocytaires pérисynaptiques (PAPs). La présence de PAPs n'est pas systématique et dans l'hippocampe ils sont généralement détectés à un peu plus de 60% des synapses (Ventura & Harris, 1999; Witcher et al., 2007). Toutefois, une étude récente utilisant une technique d'imagerie à 2 photons suggère que la proportion de synapses contactées par un processus astrocytaire ait été sous-

évaluée (Arizono et al., 2020). En effet, les processus astrocytaires forment de petits renflements, appelés nodules, à proximité des synapses. Si environ 55% des synapses seraient contactées par ces nodules dans l'hippocampe, 35% d'entre elles seraient en étroite proximité avec un processus astrocytaire malgré l'absence de nodule. Au final, seulement 10% des synapses serait donc orpheline de contact astrocytaire (Arizono et al., 2020).

La sélection des synapses contactées par PAP n'est probablement pas due au hasard. La taille des synapses est très variable et elle dépend fortement de l'activité synaptique (Hazan & Ziv, 2020; Xu et al., 2020; Yasuda, 2017). Or, les processus astrocytaires enveloppent préférentiellement les synapses ayant les éléments synaptiques les plus larges (Witcher et al., 2007). Cela pourrait correspondre aux synapses les plus actives. D'ailleurs, il semble que l'activité synaptique favorise le recrutement de processus astrocytaires (Cornell-Bell et al., 1990a). Il est donc probable que sur le plan fonctionnel, la plupart des synapses actives soient enveloppées par un PAP.

L'enveloppement de la synapse peut être plus ou moins important et il est modulé de manière dynamique. Il a été montré que la proximité du PAP avec les éléments neuronaux dépendait de l'état physiologique de l'individu et était influencé par l'activité synaptique. Par exemple, une étude récente a mis en évidence des variations circadiennes dans la distance à la synapse, ce qui pourrait impacter les capacités mnésiques (McCauley et al., 2020). Une autre étude montre que l'induction de la LTP provoquerait le retrait des PAPs (Henneberger et al., 2020). La proximité des PAPs permet entre autre de contrôler la recapture du glutamate et leur retrait favoriserait donc la diffusion du glutamate au-delà de la synapse.

3.4.2. Détection du signal

Si les PAPs peuvent être modulés en fonction de l'activité neuronale, c'est qu'ils sont capables de détecter la transmission synaptique. Il y a 30 ans, une première série d'études sur des astrocytes en culture a permis de mettre en évidence l'expression des récepteurs au glutamate (Glaum et al., 1990; Usowicz et al., 1989; Wyllie et al., 1991) et au GABA (Bormann & Kettenmann, 1988). Il a ensuite été montré directement que les astrocytes en co-culture avec des neurones détectent l'activité neuronale excitatrice (Murphy et al., 1993). Dans les années 1990, il est confirmé que les astrocytes sont capables de détecter la transmission synaptique *in situ*. En effet, sur des tranches aiguës d'hippocampe, l'application de glutamate induit un signal calcique dans les astrocytes (Porter & McCarthy, 1995a). Cette même équipe montre ensuite que le blocage pharmacologique des récepteurs mGluR supprime la réponse calcique, ce qui indique que les astrocytes sont activés par l'intermédiaire des récepteurs mGluR lors de la transmission synaptique. De plus, lorsque la

transmission est intensifiée par le blocage de canaux potassiques, une composante de la réponse astrocytaire est induite par les récepteurs ionotropiques au glutamate (Porter & McCarthy, 1996).

Aujourd'hui, il semble évident que les astrocytes sont capables de détecter la transmission synaptique à toutes les synapses *via* des récepteurs spécialisés. En fonction du type de synapse, ils expriment les récepteurs pour le glutamate et le GABA mais aussi pour l'ATP (Zhang et al., 2003) et l'adénosine (Porter & McCarthy, 1995b), l'acétylcholine (Araque et al., 2002), la noradrénaline (Fischer et al., 2021), la dopamine (Khan et al., 2001), la sérotonine (Hansson et al., 1987), les endocannabinoïdes (Han et al., 2012), l'oxyde nitrique (Matyash et al., 2001) et le BDNF (« brain-derived neurotrophic factor ») (Rose et al., 2003).

Au niveau des synapses glutamatergiques de l'hippocampe, les astrocytes détectent le glutamate principalement par l'intermédiaire des mGluR de sous types 3 et 5 (Cai & Kimelberg, 1997; Schools & Kimelberg, 1999; Shelton & McCarthy, 1999; Yoshida et al., 2003). Le pattern d'expression des récepteurs peut toutefois varier selon la structure. Ainsi, dans les astrocytes de la moelle épinière, les récepteurs mGluR1 sont exprimés alors que les mGluR5 sont peu détectés (Silva et al., 1999). Le mGluR5 semble être le principal responsable de l'activation des astrocytes (Cai & Kimelberg, 1997; Yoshida et al., 2003). Je détaillerai son rôle dans la détection de la transmission dans la partie 4.

Les astrocytes peuvent aussi exprimer des récepteurs ionotropiques au glutamate et notamment les RAMPs (Jabs et al., 1994; Seifert & Steinhäuser, 1995; Shelton & McCarthy, 1999). Concernant le RNMDA, il a été détecté dans les astrocytes en culture (Fan et al., 1999) et son expression *in situ* a été confirmée dans des astrocytes corticaux (Aoki et al., 1994; Lalo et al., 2006; Schipke et al., 2001). Cependant, il a été suggéré que leur expression à l'âge adulte ait lieu principalement en conditions pathologiques, par exemple lors d'une ischémie (Krebs et al., 2003). Dans l'hippocampe, la présence de RNMDA astrocytaire est plus controversée. Son existence a été suggérée sur le plan fonctionnel étant donné que le NMDA, un agoniste spécifique, a un effet direct sur les astrocytes (Latour et al., 2001; Serrano et al., 2008). Des résultats qui semblent en contradiction avec les études précédentes, réalisées sur des astrocytes fraîchement isolés (Seifert & Steinhäuser, 1995) ou *in situ* (Shelton & McCarthy, 1999). Cela pourrait s'expliquer par le fait que seule une sous population d'astrocytes exprimerait le RNMDA dans cette structure (Serrano et al., 2008). Une étude plus récente va dans le sens de la présence de RNMDA fonctionnels dans l'hippocampe, qui joueraient notamment un rôle dans la plasticité hétérosynaptique (Letellier et al., 2016).

3.4.3. Intégration

Contrairement aux neurones, les astrocytes ne sont pas des cellules électriquement excitables. Ainsi, l'activation des récepteurs astrocytaires ne conduit pas à la propagation d'un pulse électrique dans la cellule. Pour autant, ce sont des cellules excitables capables d'intégrer des stimuli et d'y répondre de manière dynamique. Cette excitation est encodée chimiquement, notamment par des variations de concentration du calcium cytoplasmique.

L'activation des récepteurs astrocytaires est liée à des flux intracellulaires de Ca^{2+} (Glaum et al., 1990). La signalisation calcique dans les astrocytes est très complexe, il ne s'agit pas d'un signal « tout ou rien » mais d'un mode d'intégration de l'information. Le type de signal calcique dans l'astrocyte dépend de l'intensité de la stimulation. L'activation des astrocytes par application d'une faible concentration de glutamate ($<1\mu\text{M}$) induit des événements calciques relativement brefs et localisés. Au contraire, une forte activation des récepteurs induit des oscillations calciques de fréquence constante qui se propagent dans toute la cellule ainsi qu'aux astrocytes adjacents couplés à celle-ci (Cornell-Bell et al., 1990b).

En effet, il semblerait qu'il existe plusieurs types d'événements calciques astrocytaires. D'un côté, on peut observer des vagues calciques, qui sont des événements de grande ampleur se propageant dans la cellule voire même aux astrocytes voisins. Ils peuvent ou non se reproduire de manière rythmique induisant des oscillations calciques. De l'autre, on peut observer des microdomaines calciques, qui sont des événements très brefs et localisés dans les fins processus astrocytaires. Ces deux types d'événements se produisent à des échelles temporelles et spatiales différentes et sont sous-tendus par des mécanismes qui leur sont propre (Bazargani & Attwell, 2016).

Le Ca^{2+} impliqué dans les événements calciques provient en grande majorité des stocks intracellulaires. Le réticulum endoplasmique (RE) est la principale source de Ca^{2+} . Les voies de signalisation de plusieurs récepteurs astrocytaires convergent vers la production d'inositol triphosphate (IP3). L'IP3 agit sur ses récepteurs (IP3R) présents sur la membrane du RE et induit la libération de Ca^{2+} (Bootman et al., 2001). Il y a trois types d'IP3R exprimés dans les astrocytes : IP3R1, IP3R2, IP3R3 (Iwai et al., 2005; Mignery et al., 1989). L'IP3R2 a longtemps été considéré comme le seul sous-type fonctionnel dans les astrocytes. Il a donc été de loin le plus étudié. Le développement de souris transgéniques KO pour le gène IP3R2 a permis de montrer l'importance de la signalisation calcique astrocytaire liée au RE dans la régulation de la transmission (Chen et al., 2012; Gómez-Gonzalo et al., 2015; Navarrete et al., 2012; Perea et al., 2016). Cependant, un certain nombre d'études présente des résultats qui sont en contradiction avec l'importance donnée à ce récepteur dans la signalisation calcique. En effet, dans certaines conditions, la délétion du IP3R2 astrocytaire n'impacte

pas le fonctionnement du réseau (Agulhon et al., 2010; Petracicz et al., 2008). Les auteurs ont alors conclu l'absence d'implication du Ca^{2+} issu du RE sur la transmission. Toutefois, des études plus récentes soulignent que les autres récepteurs astrocytaires IP3R1 et IP3R3 joueraient aussi un rôle important dans la signalisation calcique (Okubo et al., 2019; Sherwood et al., 2017, 2021a).

Si la signalisation des RCPG est largement couplée à la libération du Ca^{2+} du RE, il existe d'autres sources de calcium. En effet, la mitochondrie qui est présente au niveau des PAPs pourrait être une source de calcium importante dans les microdomaines (Agarwal et al., 2017). Le calcium peut aussi provenir du milieu extracellulaire et entrer dans la cellule suite à l'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L (Letellier et al., 2016) du récepteur « Transient receptor potential ankyrin 1 » (Shigetomi et al., 2013), du canal « Transient receptor potential canonical » (Shiratori-Hayashi et al., 2021) ou encore par l'intermédiaire de l'échangeur sodium-calcium (Rose et al., 2020). L'hétérogénéité des sources de calcium souligne la complexité de la signalisation calcique astrocytaire. Il est très probable que le Ca^{2+} issu de ces différentes sources joue des rôles distincts dans la cellule. D'ailleurs, l'entrée de Ca^{2+} au niveau de la membrane plasmique peut induire dans un second temps une libération de Ca^{2+} par le RE.

3.4.4. Gliotransmission

La capacité des astrocytes en culture à libérer des substances neuroactives a été mise en évidence dès 1990 en conditions de stress osmotique (Kimelberg et al., 1990). En 1994, Parpura et al. montrent que la libération de transmetteurs par l'astrocyte dépend d'une élévation de la concentration intracellulaire en calcium et donc peut se produire en conditions physiologiques (Parpura et al., 1994). Les transmetteurs libérés par les astrocytes ont été appelés gliotransmetteurs. En plus du glutamate, de l'aspartate et de la taurine découverts au départ (Bezzi et al., 2004; Kimelberg et al., 1990), d'autres ont été identifiés par la suite. Il y a notamment le $\text{TNF}\alpha$ (« tumor necrosis factor α ») (Stellwagen & Malenka, 2006) mais aussi la D-serine (Henneberger et al., 2010; Panatier et al., 2006) et l'ATP (Cao et al., 2013). Les rôles de ces derniers seront développés dans la partie 4.

Le mode de libération des gliotransmetteurs ne fait toujours pas consensus. L'exocytose semble être le principal mode de libération mais n'est pas le seul possible et il se peut que plusieurs d'entre eux coexistent, dépendamment du type de gliotransmetteurs et des conditions physiologiques.

Le premier argument en faveur d'une libération vésiculaire est le fait que les astrocytes possèdent la machinerie nécessaire à l'exocytose. En effet, ils possèdent un compartiment à « microvésicules de type synaptique » qui contient tous les éléments nécessaires à la capture, au stockage et à la libération de glutamate (Bezzi et al., 2004). Sur le plan morphologique, les

« microvésicules de type synaptique » sont similaires aux vésicules présynaptiques des neurones mais sont présente de manière bien moins dense. Elles forment des petits groupes très proches de la membrane plasmique, localisés en face de la synapse (Volterra & Meldolesi, 2005). Ces vésicules expriment les protéines nécessaires au mécanisme d'exocytose, notamment les protéines SNARE (« Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor ») et « vesicle-associated membrane protein 3 ». La présence de gliotransmetteurs, comme le glutamate ou la D-sérine, a été détectée dans ces vésicules (Bergersen et al., 2012).

Parmi les mécanismes de libération non exocytotiques on retrouve la libération d'ATP (Stout et al., 2002) ou de glutamate (Ye et al., 2003) par des hémicanaux de connexine 43. Cependant, la probabilité d'ouverture de ces hémicanaux serait très faible en conditions physiologiques. Une seconde possibilité est que la libération de neurotransmetteurs tels que du glutamate, de la taurine ou de l'ATP, pourrait se faire par l'intermédiaire de canaux « Volume-Regulated Anion Channels » (Kimelberg et al., 1990). Cela se produirait en cas de gonflement astrocytaire, phénomène qui se manifeste en conditions pathologiques lors d'un stress osmotique. Enfin, la libération de glutamate astrocytaire pourrait avoir lieu par l'intermédiaire du récepteur à l'ATP P2X7, ayant la particularité de pouvoir former un pore membranaire. Ce récepteur n'étant activé que par de très fortes concentrations d'ATP (>100μM), il est plus probable qu'il soit impliqué dans la réaction à un évènement anormal/pathologique.

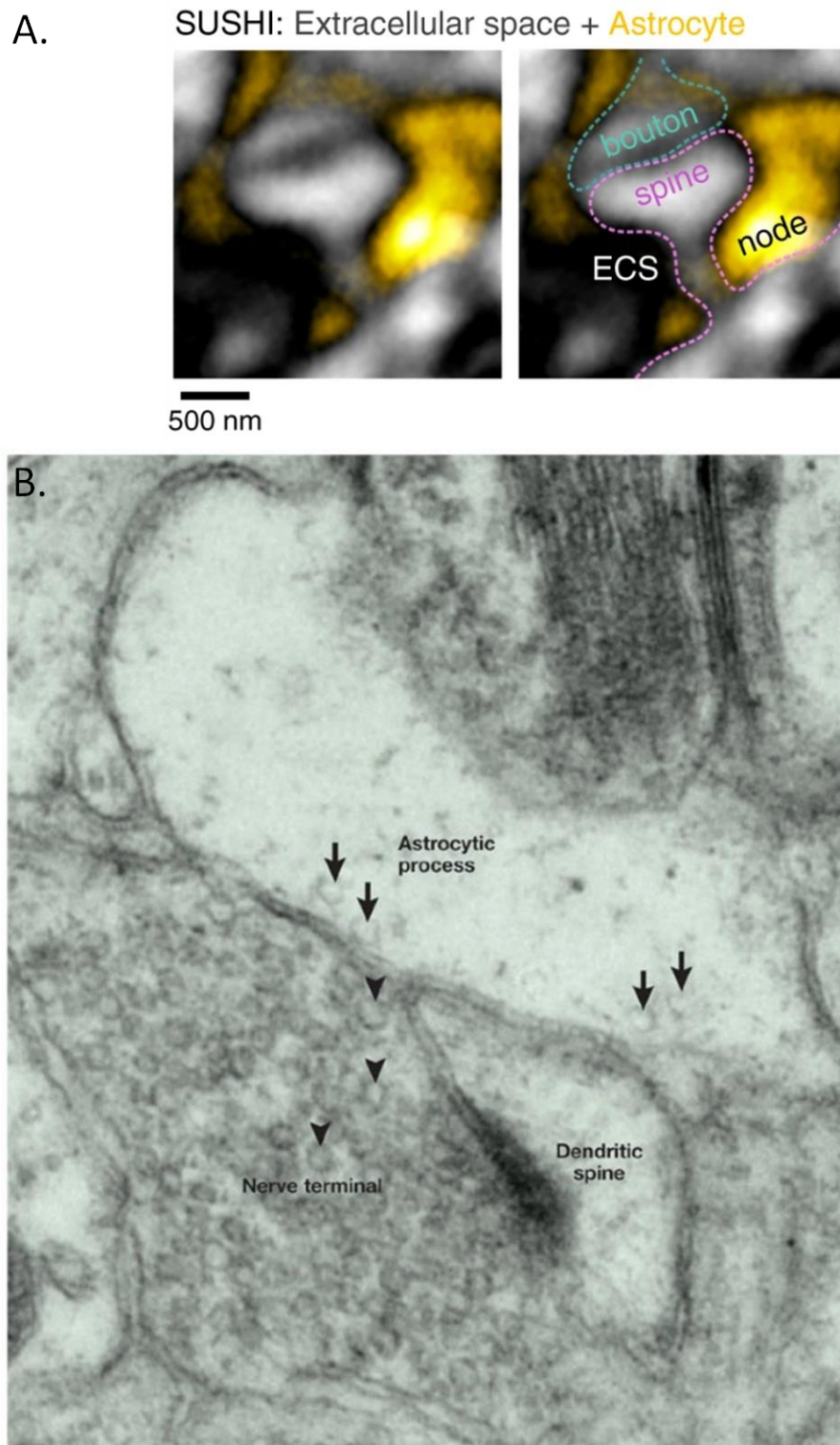


Figure 6 : Le PAP est le troisième élément de la synapse tripartite. **A.** Image d'une synapse tripartite visualisée par microscopie optique à haute résolution STED. On distingue les éléments neuronaux (gris) et le nodule astrocytaire (jaune). Tiré de Arizono et al., 2020 **B.** Photomicrographie électronique de vésicules de type synaptiques dans un processus astrocytaire (flèches) dans le gyrus denté de l'hippocampe. Ces vésicules sont similaires aux vésicules synaptiques (pointes). Elles se situent à proximité des sites pré et postsynaptiques. Photomicrographie tirée de Volterra & Meldolesi, 2005.

4. Modulation de la transmission synaptique de base et de la plasticité par les purines astrocytaires dans l'hippocampe

4.1. Détection par le récepteur mGluR5

Comme décrit dans la partie 3.4.2, les PAPs expriment différents récepteurs. Dans cette section, nous allons détailler le rôle clé du mGluR5 dans la détection de la transmission synaptique par l'astrocyte.

4.1.1. Structure et caractéristiques du récepteur

Découverts dans les années 1980, les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) appartiennent à la famille C des récepteurs couplés aux protéines G. comme tous les RCPG ils possèdent 7 domaines transmembranaires en hélice α et sont fonctionnels sous forme de dimères. L'une des caractéristiques des récepteurs de la classe C est leur long segment N-terminal extracellulaire. Celui-ci prend une conformation caractéristique appelée domaine « Venus flytrap » (VFT) (Kniazeff et al., 2011). Ce nom évoque la plante carnivore Dionée attrape-mouche (« Venus flytrap » en Anglais). En effet, ce domaine contient le site de liaison orthostérique du ligand. Sa liaison induit un changement de conformation et les deux lobes VFT se referment sur le ligand comme les lobes de la Dionée au contact d'un insecte (Kunishima et al., 2000). Cette conformation est nécessaire pour une activation optimale du récepteur (Kniazeff et al., 2004). Le domaine VFT est relié aux segments transmembranaires par l'intermédiaire d'un domaine riche en cystéine (Pin & Bettler, 2016). Ce segment transmembranaire contient des sites de liaison allostériques qui sont importants pour la régulation positive ou négative du récepteur (Leach & Gregory, 2017). Enfin, la partie C-terminale intracellulaire est importante pour l'interaction avec des protéines intracellulaires et en particulier Homer 1b/c (voir paragraphe suivant).

A ce jour, 8 mGluRs ont été clonés (mGluR1-8) et ils ont été divisés en 3 groupes (I, II et III) en fonction de leur homologie de séquence et de leur voie de signalisation (Hermans & Challiss, 2001). Le mGluR5 et le mGluR1 sont les sous-types du groupe I (mGluRI). Les mGluRI sont couplés à une protéine Gq/11 dont la voie canonique est l'activation de la phospholipase C β (PLC β). La PLC clive le phosphatidylinositol en diacylglycérol (DAG) et IP3. Le DAG active la protéine kinase C (PKC), impliquée dans plusieurs voies de signalisation, et les IP3 se fixent à leurs récepteurs (IP3R) au niveau de la membrane du RE. Cela permet la libération de calcium depuis les stocks internes. En plus de former des homodimères fonctionnels, les mGluR5 peuvent faire des hétérodimères avec les mGluR1 (Pin & Bettler, 2016).

Le gène codant pour le mGluR5 est GRM5. Il subit un épissage alternatif qui conduisant à la formation de 2 isoformes (mGluR5a, b), qui diffèrent au niveau de leur domaine C-terminal. Le mGluR5b a 32 acides aminés de plus que mGluR5a (Minakami et al., 1993). Un troisième isoforme, mGluR5d aurait été détecté dans l'hippocampe humain mais il n'est pas présent chez le rongeur. Ce dernier est tronqué de 267 acides aminés (Malherbe et al., 2002). L'épissage alternatif pourrait affecter la signalisation, la localisation cellulaire ou subcellulaire des récepteurs (Kilpatrick et al., 1999). Dans le cas du mGluR5, il y a peu d'informations sur le rôle des différents isoformes. Leur niveau d'expression respectif serait modulé au cours du développement, avec une prépondérance de l'isoforme mGluR5a dans le cerveau immature qui serait supplanté par l'isoforme mGluR5b chez l'adulte (Feng et al., 2021; Romano et al., 1996). Dans les neurones, l'isoforme b semble plus fréquent dans les neurones GABAergiques que glutamatergiques (Feng et al., 2021). Sur des cellules en culture, les isoformes a et b induisent une signalisation calcique équivalente et ont une sensibilité égale à la pharmacologie (Mion et al., 2001).

Les mGluR5 sont largement exprimés dans le cerveau, y compris dans l'hippocampe. La localisation subcellulaire des mGluR5 est majoritairement post-synaptique et dans les zones pérисynaptiques (Romano et al., 1995).

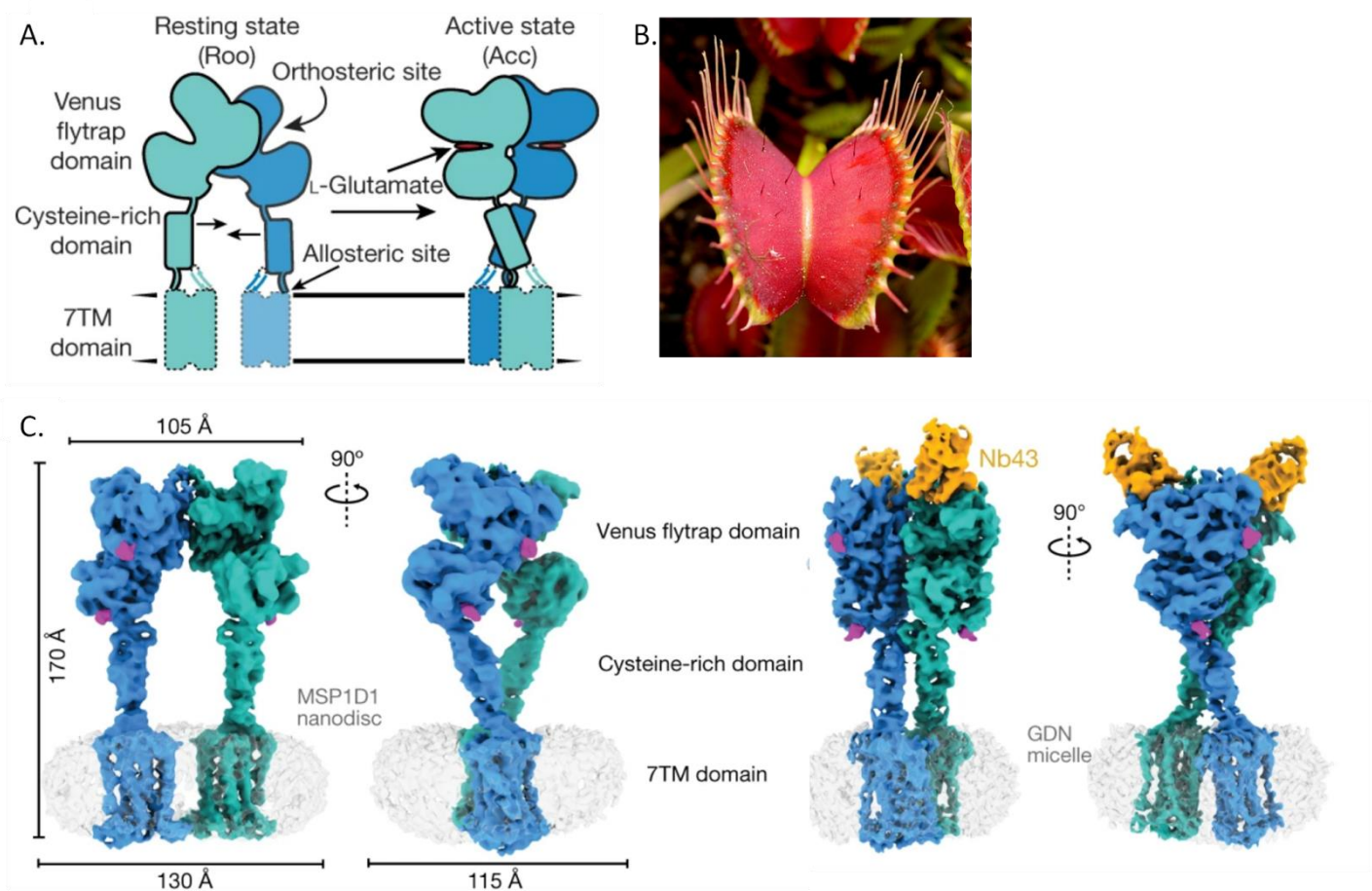


Figure 7 : Structure du mGluR5 **A.** Représentation schématique de la partie extracellulaire et transmembranaire du mGluR5 en conformation basale (Resting state) et lors de l'interaction avec le ligand (Active state). **B.** Image de *Dionée* attrape-mouche qui évoque le domaine "venus flytrap" du récepteur. **C.** Structure 3D du mGluR5 déterminée par cryo-microscopie électronique. Les images de gauche montrent le mGluR5 en conformation basale (Resting state) et celles de droite le mGluR5 en interaction avec le ligand (Active state). Le Nb43 est un nanocorps permettant de stabiliser la conformation du récepteur. La structure et le schéma sont tirés de Koehl et al., 2019.

4.1.2. Interaction avec Homer

Au niveau intracellulaire, le mGluR5 interagit principalement avec Homer qui est une protéine de la densité postsynaptique. Celle-ci est constituée d'un domaine EVH1 (« Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) homology 1 ») en N-terminal et de deux motifs « leucine zipper » en C-terminal (Kato et al., 1998). Le domaine EVH1 permet notamment l'interaction avec un segment riche en proline de la partie C-terminale du récepteur mGluR5. Les motifs « leucine zipper » permettent l'interaction avec d'autres effecteurs et/ou la multimérisation avec d'autres protéines Homer (Kato et al., 1998).

Chez les mammifères, il existe trois gènes différents qui codent pour les protéines Homer 1, 2 et 3 respectivement. L'importance relative des différentes protéines Homer dépend de la structure cérébrale. Dans l'hippocampe, on retrouve principalement Homer 1 dans le CA1 alors qu' Homer 3 est présent dans le CA3 (Shiraishi et al., 2004).

L'acide ribonucléique (ARN) messager (ARNm) Homer 1 peut subir un épissage alternatif donnant 3 isoformes : une forme courte Homer 1a et deux formes longues Homer 1b/c (Ehrengruber et al., 2004). Les isoformes longs se multimérisent et jouent un rôle important pour le mGluR5 car sont les intermédiaires qui lui permettent d'interagir avec les autres protéines synaptiques (Xiao et al., 1998). Ils sont essentiels pour que sa signalisation intracellulaire induise la libération de calcium du RE (Sala et al., 2005). En effet, Homer 1 interagit avec les IP3R du RE qui sont les cibles de sa voie de signalisation, créant ainsi un cluster fonctionnel (Ehrengruber et al., 2004). Ainsi, la proximité physique des mGluR5 et des IP3R permet une signalisation efficace.

L'expression de l'isoforme court Homer 1a n'est pas constitutive mais induite par l'activité synaptique (Bottai et al., 2002). Contrairement aux isoformes longs, il ne possède pas les motifs « leucine zipper » et n'a donc pas la capacité de former des multimères. De fait, en se liant au mGluR5 par son seul site de liaison, il empêche les interactions avec les effecteurs intracellulaires et bloque sa signalisation (Bottai et al., 2002; Xiao et al., 1998). Le Homer 1a pourrait donc faire partie d'un processus de régulation de la transmission synaptique en exerçant un rétrocontrôle négatif sur les récepteurs de la densité postsynaptique en cas d'activité intense. Il a d'ailleurs été montré que la surexpression du Homer 1b/c potentialise la signalisation mGluR5, alors que la surexpression du Homer 1a l'inhibe dans les neurones (Wagner et al., 2015). Sur le plan cognitif, le ratio Homer 1a/Homer 1b/c a des conséquences sur la mémoire (Ménard & Quirion, 2012).

4.1.3. Rôles du mGluR5 astrocytaire

Le récepteur mGluR5 est également exprimé par les astrocytes (Miller et al., 1996; Schools & Kimelberg, 1999). C'est un récepteur clé pour la signalisation calcique astrocytaire (Nakahara et al., 1997; Servitja et al., 1999). Dans l'hippocampe son activation génère principalement des éléments calcique brefs et localisés aux microdomaines bien qu'il puisse aussi être à l'origine de vagues calciques propagés dans l'astrocyte (Honsek et al., 2012; Panatier et al., 2011; Tang et al., 2015). Le blocage de leur voie de signalisation altère la libération de gliotransmetteurs, notamment le glutamate et les purines, et cela impacte la neurotransmission (D'Ascenzo et al., 2007; Fiacco & McCarthy, 2004; Panatier et al., 2011).

Dans les astrocytes, les mGluR5 sont situés principalement au niveau des PAPs (Lavialle et al., 2011). Il existerait une barrière moléculaire sélective qui restreindrait la diffusion de ces récepteurs entre les processus et le soma (Arizono et al., 2012).

Les propriétés des mGluR5 astrocytaires sont proches de celles des mGluR5 neuronaux. Ils ont la même affinité pour le glutamate même s'ils présentent une désensibilisation réduite (Balázs et al., 1997). La voie de signalisation des mGluR5 dans les astrocytes est la même que dans les neurones. Ils sont couplés à une protéine Gq et leur activation conduit notamment à la production d'IP3 qui induit une libération de calcium depuis les stocks intracellulaires du RE. Comme dans les neurones, l'efficacité de cette voie de signalisation est due à l'interaction du mGluR5 avec la protéine Homer 1b/c (Dziedzic et al., 2003). En effet, cette protéine permet le recrutement du RE et de ses IP3R proches des mGluR5 et de la membrane plasmique, comme c'est le cas pour les éléments neuronaux de la synapse (Buscemi et al., 2017). De plus, la protéine Homer 1a qui est détectée seulement dans les neurones en conditions physiologiques (Brakeman et al., 1997), serait exprimée dans les astrocytes réactifs. Cet isoforme altère la signalisation du récepteur en désorganisant le cluster fonctionnel formé avec les IP3R du RE, comme elle le fait dans les neurones. Cela a pour conséquence une altération de la signalisation calcique et de la libération des gliotransmetteurs (Buscemi et al., 2017).

Le niveau d'expression du mGluR5 dans les astrocytes est plus faible que dans les neurones mais leur couplage aux effecteurs intracellulaires est bien plus efficace. En effet, il a été montré que la capacité du mGluR5 astrocytaire à provoquer l'hydrolyse du phosphatidylinositol est plus grande que celle des mGluR5 neuronaux (Balázs et al., 1997). Cette expression est régulée lors du développement. Chez les rongeurs, un pic d'expression du mGluR5 astrocytaire se produit environ une à deux semaines après la naissance (Schools & Kimelberg, 1999; Sun et al., 2013). La présence du mGluR5 diminue par la suite dans les astrocytes de l'hippocampe (Cai et al., 2000; Sun et al., 2013) et dans le cerveau d'une manière générale (Casabona et al., 1997; van den Pol et al., 1995). Dans certaines études, cette

diminution dans les astrocytes a conduit à un échec de la détection du mGluR5 chez l'adulte (Sun et al., 2013). Les auteurs en ont alors conclu l'absence du mGluR5 et ont remis en cause son rôle chez l'adulte. Ce point sera discuté plus en détail dans la discussion.

4.2. Rôle des purines astrocytaires

En réponse à l'activation du mGluR5 l'astrocyte peut libérer une purine, l'ATP. La signalisation purinergique est très complexe et l'ATP présent dans l'espace extracellulaire peut modifier la transmission synaptique en se liant à différents récepteurs neuronaux et gliaux. Il est rapidement dégradé lorsqu'il est hors de la cellule et ses métabolites, en particulier l'adénosine, ont leurs propres récepteurs et modulent à leur tour la transmission. J'aborderai rapidement le métabolisme des purines avant de détailler leur rôle dans la transmission.

4.2.1. Métabolisme des purines

Les purines sont des bases azotées hétérocycliques. Elles sont les composantes de base de nombreuses molécules clés du métabolisme d'une cellule notamment l'Adénine, Guanine, Thymine, Cytosine et Uracile. Ces dernières sont les 5 bases azotées les plus représentées dans une cellule car elles forment les briques élémentaires des acides nucléiques (A, T, C, G pour l'acide désoxyribonucléique (ADN) et A, U, C, G pour l'ARN). Lorsqu'elles sont associées à un pentose, comme c'est le cas dans les acides nucléiques, les bases azotées forment alors des nucléosides. Ceux-ci peuvent lier entre un et trois groupements phosphate sur leur carbone 5'. Ils forment alors des nucléotides mono-, di- ou tri-phosphate (Liu et al., 2019).

L'adénosine est un nucléoside constitué de l'association de la base azotée adénine à un ribose. Ses nucléotides sont l'Adénosine Mono-, Di- ou Tri-Phosphate abrégés en AMP, ADP et ATP respectivement. L'ATP est connue pour être la molécule de l'énergie. Le ratio de concentration entre l'ATP et l'ADP étant maintenu loin de l'équilibre, le clivage de l'ATP en ADP est une réaction fortement exergonique. Cette réaction permet donc la réalisation d'un travail lorsqu'elle est couplée à une réaction endergonique. Ainsi, l'ATP est la principale source énergétique de la cellule. En effet, la grande majorité des réactions endergoniques du métabolisme est couplée à l'hydrolyse d'un de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire pour entraîner la réaction (Suarez, 2012).

Synthèse d'ATP et d'adénosine

L'ATP est formé à partir d'ADP. Il est très majoritairement produit par phosphorylation oxydative dans la mitochondrie, dans cadre de la respiration cellulaire. Il peut également être produit

au cours de la glycolyse ou du cycle de Krebs. La concentration basale d'ATP dans la cellule est de l'ordre de 3 à 10mM. La consommation d'ATP étant très importante dans la cellule, sa dégradation est la source principale d'adénosine intracellulaire. Ainsi, l'accumulation d'adénosine dans la cellule est le marqueur d'une activité métabolique importante. La concentration intracellulaire d'adénosine serait d'environ 30 à 300nM (Liu et al., 2019).

ATP et adénosine dans l'espace extracellulaire

En plus d'être des molécules centrales du métabolisme de toutes les cellules, l'adénosine et ses nucléotides peuvent être libérés dans l'espace extracellulaire où ils jouent un rôle clé dans la signalisation entre les cellules

Concernant l'ATP, sa concentration basale dans l'espace extracellulaire est très faible et maintenue en dessous de 10nM (Burnstock & Verkhratsky, 2012). Cela est notamment dû à la présence d'ectonucléotidases qui métabolisent rapidement l'ATP une fois qu'il est libéré. Ce dernier est dégradé en ADP puis en AMP par l'enzyme nucléoside triphosphate diphosphohydrolase, (Robson et al., 2006) ou alors directement en AMP par la nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (Stefan et al., 2006). L'AMP est converti en adénosine par l'enzyme ecto-5'-nucléotidase.

L'adénosine extracellulaire peut être issue de la dégradation de l'ATP mais aussi d'une libération par les cellules (voir paragraphe suivant). Sa concentration est comprise entre 50 et 200 nM (Latini & Pedata, 2001).

Dans l'espace extracellulaire, l'adénosine peut être convertie en inosine puis en hypoxanthine ou en ribose-1 phosphate par l'action combinée de l'adénosine désaminase (ADA) et de la purine nucléoside phosphorylase ectosoliques (Wall et al., 2007). Cependant, l'élimination de l'adénosine se fait en grande partie dans les astrocytes. Ceux-ci capturent l'adénosine extracellulaire par l'intermédiaire de deux transporteurs équilibratifs (ENT1/2) et un transporteur concentratif. L'adénosine est ensuite catabolisée dans la cellule, soit en inosine par l'ADA, soit en AMP par l'adénosine kinase (AdoK) qui est principalement exprimée par les astrocytes (Boison et al., 2010). L'AdoK, du fait de son activité plus élevée (K_m beaucoup plus faible), régule les concentrations intracellulaires d'adénosine de manière prépondérante en conditions physiologiques (Camici et al., 2018). De fait, l'AdoK astrocytaire contrôle les taux d'adénosine circulant dans le SNC et sa délétion transgénique est létale.

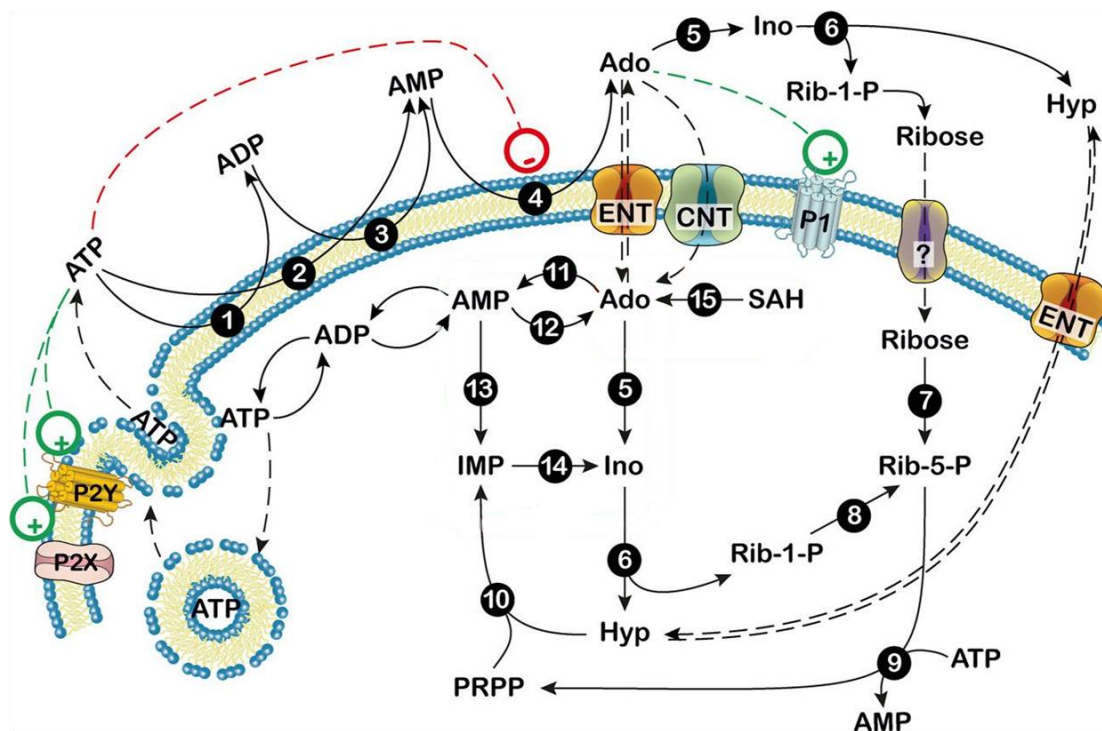


Figure 8 : Métabolisme des purines. Représentation schématique de l'Adénosine, de l'ATP et de leurs métabolites ainsi que des enzymes impliquées dans leur synthèse et leur dégradation . 1,3: ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; 2: ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; 4: ecto-5'-nucleotidase; 5: adenosine deaminase; 6: purine nucleoside phosphorylase; 7: ribokinase; 8: phosphoribomutase; 9: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthetase; 10: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; 11: adenosine kinase; 12: cytosolic 5' nucleotidase I; 13: AMP deaminase; 14: cytosolic 5' nucleotidase II; 15 :S-adenosylhomocysteine hydrolase. Ado: adenosine; CNT: concentrative nucleoside transporter; ENT: equilibrative nucleoside transporter; Hyp: hypoxanthine; Ino: inosine; P1: purinergic receptor type 1; P2: purinergic receptor type 2; Rib-1-P: ribose-1-phosphate; Rib-5-P: ribose-5-phosphate. Modifié d'après Garcia-Gil et al., 2021.

4.2.2. Régulation de la transmission synaptique dans l'hippocampe par les purines

Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressé à la modulation de la transmission par l'activation des récepteurs A_{2A} à l'adénosine. Toutefois, je pense qu'il est important d'avoir un aperçu plus général de la signalisation purinergique et c'est pourquoi je vais brièvement aborder le rôle des autres récepteurs à l'ATP et à l'adénosine

Dès 1929, Drury et Szent-Györgyi suggèrent un rôle des purines dans la signalisation en montrant un effet vasodilatateur de l'adénosine. Le rôle de l'ATP dans la transmission synaptique a été suggéré pour la première fois par Burnstock dans les années 1970 (Burnstock, 1975). Cependant, cette idée ne convainc pas immédiatement la communauté scientifique tant la dualité des rôles de cette molécule semble surprenant. Le débat sur l'existence d'une signalisation extracellulaire par libération d'ATP prend fin dans les années 1990, avec le clonage des récepteurs à l'ATP et l'enregistrement par électrophysiologie de la libération d'un quantum d'ATP.

Le système purinergique est le système de signalisation extracellulaire le plus répandu. Il est présent dans tout l'organisme et la quasi-totalité des cellules du corps expriment au moins un type de récepteur purinergique. On discutera ici le rôle des purines dans le SNC en portant une attention particulière à l'hippocampe.

4.2.2.1. Libération de purines

L'adénosine et l'ATP étant des molécules clés du métabolisme, elles sont présentes dans toutes les cellules. Pour pouvoir jouer un rôle dans la signalisation, ces molécules doivent être libérées dans l'espace extracellulaire de manière contrôlée.

4.2.2.1.1. *Libération d'ATP*

Il existe différents mécanismes de libération de l'ATP, notamment le transport par diffusion passive via des canaux perméables à l'ATP, le transport actif par des transporteurs spécifiques ou encore l'exocytose.

La libération vésiculaire est le mode de libération le plus courant. L'ATP est chargé dans les vésicules par un transporteur spécifique (Sawada et al., 2008) puis libéré par exocytose au niveau des terminaisons synaptiques des neurones (Fields, 2011; Pankratov et al., 2006), des astrocytes (Koizumi, 2010) et de la microglie (George et al., 2016; Imura et al., 2013). Dans les neurones, l'ATP est un co-transmetteur. Il peut s'accumuler dans des vésicules contenant un neurotransmetteur comme le Glutamate, le GABA, la noradrénaline ou l'acétylcholine et être co-libéré lors de l'exocytose (Pankratov et al., 2006). Il existe également des vésicules neuronales dans lesquelles l'ATP est le

neurotransmetteur principal. Cela a été attesté dans le système nerveux périphérique (Stevens & Fields, 2000) et suggéré au niveau du diencephale (Pankratov et al., 2006). L'ATP peut aussi être libéré par les vésicules de sécrétion lysosomales des astrocytes (Oya et al., 2013) et de la microglie (Dou et al., 2012). Il serait possible que des neurones du système nerveux périphérique utilisent aussi ce mode de libération (Jung et al., 2013).

On retrouve également des exemples de libération d'ATP non vésiculaire. L'importance de cette libération en conditions physiologique est sujette à débat. Il est probable que ces mécanismes de libération soient plutôt impliqués en conditions pathologiques. D'ailleurs, un stress mécanique ou métabolique de la cellule induit souvent une libération d'ATP. Les modes de libération non vésiculaires identifiés sont soit par des hémicanaux de connexine (Stout et al., 2002) ou de pannexine (Iglesias et al., 2009) soit par le récepteur P2X7 (Suadicani et al., 2006). En effet, en conditions pathologiques les récepteurs à l'ATP P2X7 pourraient former un large pore qui serait perméable à l'ATP.

4.2.2.1.2. Origine de l'adénosine extracellulaire

L'adénosine extracellulaire peut avoir plusieurs origines. En conditions basales, elle provient principalement de la dégradation de l'ATP (Halassa & Haydon, 2010) ou de l'AMPc libérés dans l'espace extracellulaire (Latini & Pedata, 2001). Lors d'une activité neuronale plus soutenue, la consommation d'ATP au sein des neurones augmente, ce qui conduit à une accumulation d'adénosine intracellulaire. Dans ces conditions, l'adénosine peut être directement libérée par les neurones via les transporteurs équilibratifs ENT1/2 (Lovatt et al., 2012). Au final, il semblerait que l'apport en adénosine extracellulaire pendant la transmission synaptique implique ces deux mécanismes dans des proportions équivalentes (Wall & Dale, 2013). En conditions pathologiques, comme dans le cas d'une ischémie ou d'une épilepsie, le taux d'adénosine peut être anormalement élevé dans les neurones. La libération via les transporteurs deviendrait alors trop importante (Dale & Frenguelli, 2009).

4.2.2.2. Les récepteurs purinergiques

Il existe 3 types de récepteurs purinergiques dans le SNC. Les récepteurs de classe « P0 » lient la base azotée Adénine, les récepteurs de classe « P1 » lient le nucléoside Adénosine et enfin les récepteurs de classe « P2 », lient différents nucléotides et en particulier l'ATP et l'ADP.

4.2.2.2.1. Récepteurs P0 à l'Adénine

Les récepteurs à l'Adénine n'ont été découverts que dans les années 2000 (Bender et al., 2002). Ce sont des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G dont la signalisation inhibe l'adénylate cyclase (Thimm et al., 2013). Il existe peu d'informations sur leur expression et leur rôle potentiel dans la transmission synaptique, ils sont donc encore très méconnus. On a toutefois la

confirmation de leur expression dans le SNC, notamment au niveau du cortex et du striatum (Gorzalka et al., 2005).

4.2.2.2. Récepteurs P2 à l'ATP

La signalisation de l'ATP est complexe, elle joue de nombreux rôles physiologiques et sa dérégulation est impliquée dans différentes pathologies. Selon la situation, l'ATP peut être un neurotransmetteur, neuromodulateur, gliotransmetteur ou un modulateur paracrine des cellules gliales.

On dénombre au total 15 types de récepteurs à l'ATP, exprimés dans différentes régions et différents types cellulaires. Certains sont des récepteurs canaux, les P2X, alors que les autres sont des récepteurs métabotropiques, les P2Y. Les récepteurs P2 sont exprimés dans tout l'organisme. Dans le SNC, leur expression se fait non seulement par les neurones mais aussi par les cellules gliales.

4.2.2.2.1. P2X

Le P2X est un récepteur canal activable uniquement par l'ATP. La liaison de l'ATP permet l'ouverture de son pore qui est perméable aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} (North, 2002). Il en existe 7 sous-unités, classées de P2X1 à P2X7, qui sont codées par des gènes distincts (p2rx1 à p2rx7). Les protéines de ces différentes sous-unités ont une homologie de séquence de 30 à 50%. Chaque sous-unité est constituée de deux segments transmembranaires avec les terminaisons N-terminal et C-terminal intracellulaires et une large boucle extracellulaire qui contient le site de liaison au ligand. Elles s'assemblent en homo ou hétérotrimères. Les P2X sont d'ailleurs les seuls récepteurs canaux à être fonctionnels sous forme trimérique. Tous les P2X sont exprimés dans l'hippocampe (North, 2002).

Les propriétés des récepteurs P2X, telles que leur cinétique de désensibilisation ou leur perméabilité au calcium, ainsi que leur pharmacologie dépendent des sous unités qui les composent (Egan & Khakh, 2004). La perméabilité des P2X au Ca^{2+} est globalement forte et même comparable à celle du NMDA. Ainsi, ils pourraient jouer un rôle dans la plasticité dépendante du calcium. Dans des conditions physiologiques particulières, comme lors d'une baisse du taux de calcium extracellulaire, certains P2X auraient la capacité de « dilater » leur pore, augmentant ainsi leur perméabilité aux ions et permettant le passage de molécules plus grosses (Shinozaki et al., 2009). Cependant, cette caractéristique a été sujette à débat et d'autres études suggèrent que la détection d'une dilatation du pore serait un artéfact expérimental (Peverini et al., 2018).

Rôles physiologiques dans l'hippocampe

Dans l'hippocampe, les P2X sont principalement détectés au niveau du compartiment postsynaptique des neurones glutamatergiques (Rubio & Soto, 2001). D'ailleurs, d'un point de vue

fonctionnel, la présence de courants post-synaptiques liés au P2X a été mise en évidence dans plusieurs structures cérébrales, y compris l'hippocampe. Lors de la transmission basale dans l'hippocampe, une composante du courant postsynaptique est purinergique. Celle-ci serait médiée par les P2X car elle est bloquée par leurs antagonistes (Pankratov et al., 1998). Cependant, le rôle de ces récepteurs au niveau postsynaptique est complexe. Certains P2X pourraient moduler négativement la transmission synaptique en provoquant l'internalisation des RAMPs (Pouget et al., 2014).

Le rôle des P2X dans la modulation de la plasticité à long terme est également complexe. Ces récepteurs peuvent moduler négativement la plasticité à long terme en diminuant la signalisation des RNMDA (Lalo et al., 2016). De plus, l'activation de ces récepteurs augmenterait aussi le taux basal de calcium du compartiment postsynaptique, ce qui aurait pour effet de rehausser le seuil d'induction de la LTP (Pankratov et al., 2002). Pourtant, les souris transgéniques KO pour le récepteur P2X4 présentent un déficit de LTP (Sim et al., 2006).

Il y a également des P2X au niveau présynaptique dans l'hippocampe (Khakh & Henderson, 1998). Ceux-ci peuvent moduler la libération de neurotransmetteurs des interneurons inhibiteurs mais ne semblent pas être présents au niveau des synapses glutamatergiques (Khakh et al., 2003).

Implication dans des pathologies

Une dérégulation de la signalisation P2X peut intervenir dans de nombreux types de maladie. Par exemple, on retrouve une expression anormalement élevée de certains P2X dans l'épilepsie (Engel et al., 2012). Les P2X sont impliqués dans la transmission nociceptive (Jarvis et al., 2002). De ce fait, ils jouent un rôle dans les phénomènes d'allodynie (Tsuda et al., 2003) et de douleurs neuropathiques (Kobayashi et al., 2011).

4.2.2.2.2. P2Y

Les P2Y sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Il s'agit de RCPG classique ayant 7 domaines transmembranaires en hélice α , une partie N-terminale extracellulaire nécessaire à la liaison du ligand et une partie C-terminale intracellulaire qui interagit avec la protéine G. Les P2Y peuvent avoir pour ligand plusieurs nucléotides. Il en existe 8 sous-types mais seuls deux (P2Y2 et P2Y11) sont activés par l'ATP. Les autres peuvent être activés par l'ADP, l'Uridine ou par l'UTP. Les P2Y sont classés en 2 sous-groupes en fonction de leur cascade de signalisation intracellulaire. Les récepteurs P2Y1, 2, 4, 6 et 11 sont appelés « P2Y1 like », ils sont couplés à une protéine Gq qui active la PLC et qui conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire en Calcium. Les récepteurs P2Y12, 13, 14 sont appelés « P2Y12 like », ils sont couplés à une protéine Gi qui inhibe l'adénylate cyclase et qui diminue donc la production d'AMPc. L'expression des différents types de P2Y dans le

système nerveux est dépendante des régions et des types cellulaires. Dans l'hippocampe adulte, on retrouve les P2Y1, 2,4, 6, 12 (Burnstock & Verkhratsky, 2012).

Rôles physiologiques dans l'hippocampe

Dans l'hippocampe, des P2Y sont situés au niveau des afférences noradrénergiques. Localisés sur l'élément présynaptique, ils ont un effet inhibiteur sur la libération de noradrénaline (Csölle et al., 2008). Ils pourraient également être présents dans le compartiment présynaptique des neurones glutamatergiques, jouant là aussi un rôle inhibiteur. Cela serait dû notamment à une inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type N, via la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G (Gerevich et al., 2004; Mendoza-Fernández et al., 2000). Ces P2Y présynaptiques seraient impliqués dans le phénomène de dépression hétérosynaptique à long terme, qui est une forme de plasticité touchant les synapses adjacentes à celles qui subissent une LTP (Chen et al., 2013). Ils sont également présents dans le compartiment postsynaptique des interneurons inhibiteurs. Ils ont un effet excitateur sur ces derniers et pourraient jouer un rôle dans la création des rythmes gamma (Kawamura et al., 2004).

4.2.2.2.3. Récepteur P1 à l'Adénosine

Dans le SNC, l'adénosine est un neuromodulateur important. Elle agit sur 4 sous-types de récepteurs P1 qui sont : A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 . Ces derniers sont tous des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Les récepteurs A_1 et A_3 sont couplés à une protéine $G_{i/o}$ et leur effet principal est l'inhibition de l'Adénylate cyclase. Les récepteurs A_{2A} et A_{2B} sont couplés à une protéine G_s qui stimule la production d'AMPc en activant l'Adénylate cyclase. Bien que ces quatre récepteurs soient couplés à des protéines G différentes, ils ont tous la capacité d'activer la phospholipase C et donc de promouvoir la synthèse d'IP3 et la libération de Calcium. Ils régulent également l'activation de la PKC (Offermanns & Simon, 1995; Zhu & Birnbaumer, 1996).

4.2.2.2.3.1. Le récepteur A_1

Le récepteur A_1 (RA_1) est le récepteur le plus abondant du SNC. Il est présent dans toutes les structures et en particulier dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le putamen et le cervelet (Dixon et al., 1996). Il est exprimé par les neurones mais aussi par les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (Ciccarelli et al., 2001; Daré et al., 2007).

Dans l'hippocampe, le RA_1 est principalement présynaptique (Fredholm et al., 2005) mais il a également été détecté en zone péri-synaptique et au niveau post-synaptique (Rebola et al., 2003). Son activation inhibe la transmission synaptique. Au niveau des synapses glutamatergiques, l'activation des RA_1 présynaptiques a pour effet de réduire la probabilité de libération des vésicules. Cet effet est principalement dû à une diminution de l'influx de calcium des canaux calciques voltage-dépendants

(Gundlfinger et al., 2007). Les RA₁ peuvent également être exprimés au niveau postsynaptique où ils diminuent la transmission NMDA (Klishin et al., 1995) et hyperpolarisent la cellule en modulant les canaux potassiques (Kim & Johnston, 2015). Le RA₁ serait également un acteurs clé de la dépression hétérosynaptique (Manzoni et al., 1994; Pascual et al., 2005).

4.2.2.3.2. Le récepteur A_{2A}

L'effet du récepteur A_{2A} (RA_{2A}) est opposé à celui du RA₁ car il potentialise la transmission. Il joue un rôle à la fois dans la transmission synaptique de base (Panatier et al., 2011) et dans l'induction de la LTP (Viana da Silva et al., 2016). Initialement, il n'a été détecté qu'au niveau des ganglions de la base car c'est l'endroit où il est le plus fortement exprimé. Plus tard, il a été détecté dans l'ensemble des structures du cerveau (Dixon et al., 1996).

Au niveau des synapses glutamatergiques de l'hippocampe, l'activation des RA_{2A} présynaptiques conduit à une augmentation de l'entrée de calcium par les canaux calciques sensibles au voltage. Cela se traduit par une augmentation de la probabilité de libération (Rombo et al., 2015). Cette action serait médiée d'une part par l'activation de la PKA et la phosphorylation de la synapsine I (Matsumoto et al., 2014) et d'autre part par l'activation de la PKC. Ces deux voies activeraient les canaux calciques de type P et de type N respectivement (Gubitz et al., 1996). Les RA_{2A} sont également capables de potentialiser les courants AMPA et la LTP en mobilisant des récepteurs AMPA (Dias et al., 2012). Il existerait également une interaction fonctionnelle entre les RA_{2A} et NMDA (Mouro et al., 2018; Sarantis et al., 2015). Pourtant les RA_{2A} n'ont jamais été détectés au niveau postsynaptique. Les RA_{2A} sont également impliqués dans la recapture de l'adénosine en facilitant l'activation des transporteurs ENT (Pinto-Duarte et al., 2005).

Même si le rôle de neuromodulateur du RA_{2A} est très complexe, son effet est globalement excitateur. Les RA_{2A} potentialisent les synapses glutamatergiques, en augmentant leur probabilité de libération. Ils ne potentialisent pas les synapses des interneurons GABA sur les neurones pyramidaux qui ont un rôle inhibiteur sur la transmission excitatrice. En revanche, le RA_{2A} a un effet potentialisateur au niveau des synapses GABAergiques entre deux interneurons, ce qui a pour conséquence de potentialiser la transmission glutamatergique (Rombo et al., 2015). De plus, le RA_{2A} régule négativement les modulateurs inhibiteurs tels que le récepteur aux endocannabinoïdes CB1 ou le RA₁.

4.2.2.3.3. Homo- et hétérodimérisations

Il semblerait que les récepteurs à l'adénosine, comme beaucoup de récepteurs couplés aux protéines G, soient fonctionnels sous forme d'homodimères (Canals et al., 2004). Ces récepteurs ont aussi la capacité de s'hétérodimériser avec d'autres types de récepteurs.

Le RA₁ par exemple peut se dimériser avec le récepteur dopaminergique D1 et avec le récepteur glutamatergique mGluR5. RA₁ dimérisé à D1 semble diminuer la signalisation du récepteur dopaminergique et promouvoir son inactivation (Ciruela et al., 2001; Ginés et al., 2000). Il a été montré en culture cellulaire que les RA₁ pouvaient aussi s'oligomériser avec les P2Y1 et 2. Ce complexe de récepteurs aurait une signalisation « de type A₁ » et inhiberait la transmission synaptique tout en étant sensible à la pharmacologie P2Y et donc activable par l'ATP (Yoshioka et al., 2001).

Dans le striatum, il existe des hétérodimères des RA_{2A} avec les récepteurs dopaminergiques et avec les récepteurs CB1 (Navarro et al., 2008). Les dimères A_{2A}-D2 sont présents à la fois au niveau des neurones et des astrocytes. L'activation du RA_{2A} de ces dimères aurait pour effet de diminuer la signalisation dopaminergique au niveau des neurones GABA (Guidolin et al., 2020). Concernant le CB1, le RA_{2A} diminue l'inhibition de la transmission induite par les endocannabinoïdes (Martire et al., 2011). Toujours dans le striatum, on aurait même découvert un oligomère RA_{2A} avec le récepteur glutamatergique mGluR5 (Cabello et al., 2009).

Le RA_{2A} peut également interagir avec la tyrosine kinase B qui est le récepteur au facteur de croissance BDNF (pour Brain-Derived Neurotrophic Factor). Il serait même capable de transactiver le récepteur en l'absence du ligand endogène (Lee & Chao, 2001). De plus, la modulation de la transmission synaptique par le BDNF semble dépendre de l'activité du RA_{2A}. L'activation du RA_{2A} par un agoniste permet une potentialisation de la transmission synaptique par le BDNF, alors que le blocage du RA_{2A} semble supprimer cet effet (Diógenes et al., 2004; Tebano et al., 2008).

4.2.2.2.3.4. Interactions A₁/A_{2A}

Bien que les récepteurs A₁ et A_{2A} aient des effets opposés sur la régulation de la transmission, leur présence conjointe dans les terminaisons présynaptiques des mêmes synapses a été confirmée dans l'hippocampe (Rebola et al., 2003).

De plus, des interactions fonctionnelles ont été mises en évidence entre les RA₁ et les RA_{2A} (Lopes et al., 1999). Le blocage des RA₁ par un antagoniste occlut l'effet facilitateur de l'activation des A_{2A} par un agoniste sur la transmission. L'hétérodimérisation des RA₁ et RA_{2A} a été mise en évidence dans le striatum par microscopie électronique et co-immunoprécipitation (Ciruela et al., 2006). Cette dimérisation n'avait pas d'impact sur l'affinité des récepteurs pour leurs agonistes. En revanche, l'activation du RA_{2A} semble diminuer l'affinité de l'adénosine pour le RA₁ bien que l'inverse ne soit pas vrai. Dans l'hippocampe, la présence d'un hétérodimère A₁-A_{2A} n'a pas été démontrée mais il y a bien une interaction fonctionnelle entre les récepteurs (Lopes et al., 2002). Une étude plus récente suggère qu'il pourrait s'agir de l'interaction de dimères A₁ avec des dimères A_{2A}. Il s'agirait donc du premier

complexe de récepteurs hétérotétramérique avec plusieurs protéines G différentes identifiées (Navarro et al., 2016).

L'expression des récepteurs à l'adénosine A_1 et A_{2A} varie avec l'âge (Costenla et al., 2011). On observe une augmentation progressive de l'expression des RA_{2A} au cours du vieillissement. Celle-ci est exacerbée dans certaines maladies neurodégénératives. Ces modifications d'expression induisent un changement de la balance A_1/A_{2A} et cela implique des changements de plasticité, notamment au niveau de la régulation de la LTP (Costenla et al., 2011).

4.2.2.3.5. Récepteurs A_{2B} et A_3

Plus faiblement exprimés dans le cerveau, les récepteurs A_{2B} et A_3 ont été moins étudiés que les A_1 et A_{2A} .

Le récepteur A_{2B} est peu détecté dans la plupart des structures cérébrales incluant l'hippocampe (Dixon et al., 1996). Il est exprimé par les neurones, les astrocytes et la microglie (Pedata et al., 2016). Ce récepteur serait assez similaire au RA_{2A} dans sa signalisation intracellulaire. Il a cependant une affinité plus faible pour l'adénosine, ce qui a également contribué au manque d'intérêt pour ce récepteur. Il pourrait pourtant jouer un rôle en conditions physiologiques. Son action au niveau des neurones pourrait se traduire par une diminution de la signalisation A_1 . Ainsi, le RA_{2B} serait un modérateur de l'inhibition de la probabilité de libération. Toutefois, il reste probable que ce récepteur joue surtout un rôle lorsque la concentration d'adénosine s'élève de manière anormale. Cela serait cohérent avec sa fonction dans la modulation des réponses inflammatoires et immunitaires dans certaines pathologies comme le cancer, le diabète et les maladies vasculaires (Ham & Rees, 2008). En outre, son expression augmente en situation d'hypoxie, d'ischémie ou d'inflammation (Kong et al., 2006; Pedata et al., 2016).

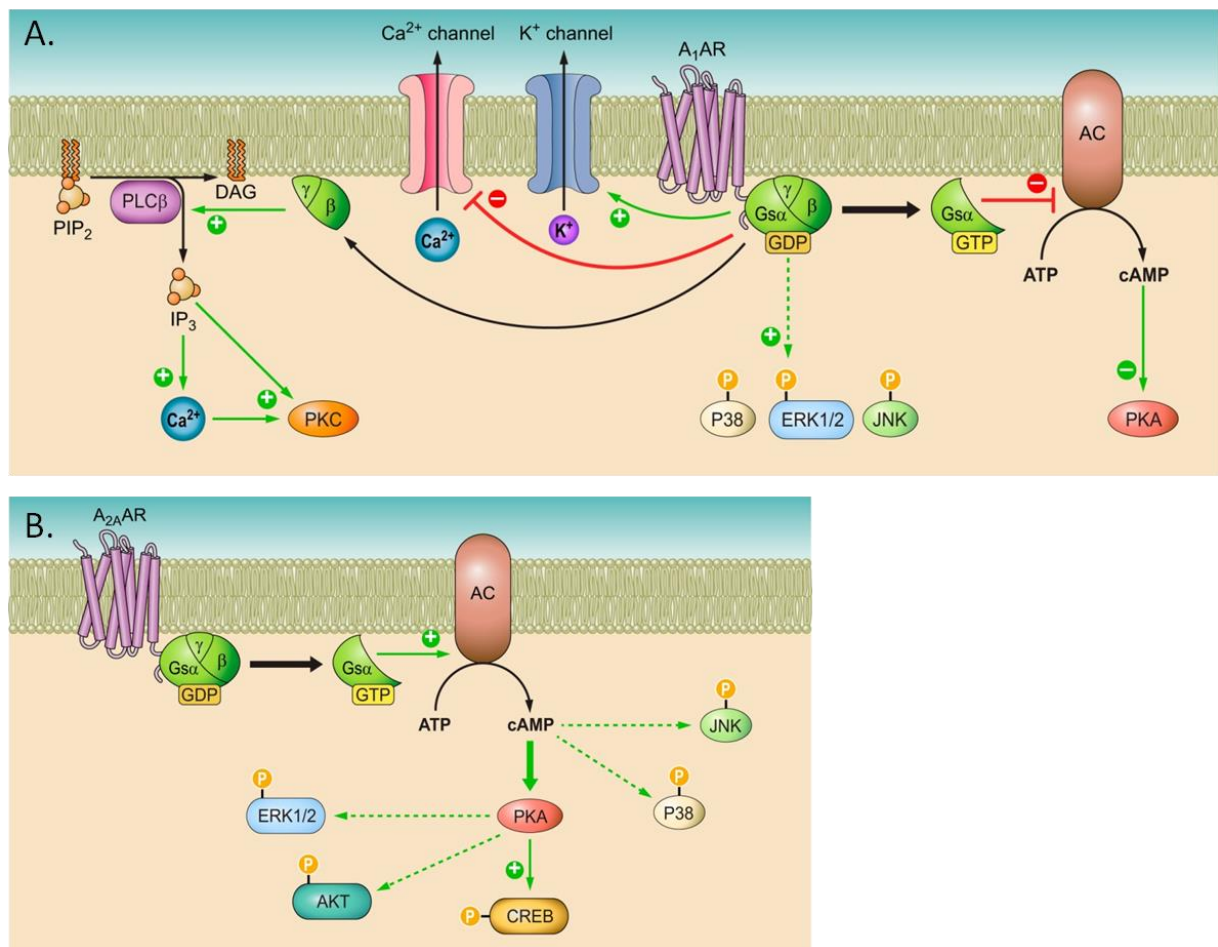


Figure 9 : Signalisation intracellulaire des récepteurs à l'adénosine. Représentation schématique des principales cascades de signalisation intracellulaire connues pour les récepteurs A1 (A.) et A2A (B.). Tiré de Borea et al., 2018.

Un quatrième type de récepteur à l'adénosine, le RA₃, a été découvert dans les années 1990 (Zhou et al., 1992). Ce récepteur, couplé à une protéine Gi/o, est le moins connu des quatre. Son niveau d'expression dans le SNC est faible et l'absence de pharmacologie spécifique a limité les études à son sujet. Il serait présent dans le striatum, le cervelet, mais aussi dans l'hippocampe, où il a été détecté sur les neurones glutamatergiques au niveau présynaptique (Lopes et al., 2003). Comme les autres récepteurs à l'adénosine, il serait également exprimé par les cellules gliales (Wittendorp et al., 2004).

4.2.2.2.4. Récepteurs purinergiques astrocytaires dans l'hippocampe

4.2.2.2.4.1. Récepteurs P1

Tous les récepteurs à l'adénosine sont exprimés par les astrocytes dans l'hippocampe. Ils sont tous liés à la signalisation calcique et à la production d'AMPC. Comme dans les neurones, le RA₁ est couplé à une protéine Gi/o dont la sous unité α inhibe l'adénylate cyclase alors que la sous unité β - γ potentialise l'activité de la PLC (Biber et al., 1997). Les récepteurs A_{2A} (Doengi et al., 2008) et A_{2B} (Jiménez et al., 1999) induisent une réponse calcique. La libération de calcium consécutive à l'activation du RA_{2A} peut conduire à la libération vésiculaire de glutamate (Kanno & Nishizaki, 2012).

Les récepteurs A₁ et A_{2A} jouent également un rôle dans la recapture des neurotransmetteurs. Le récepteur A₁ régule positivement l'expression des transporteurs au glutamate, son inhibition diminuant l'expression des EAAT/GLT1. Au contraire, l'activation du RA_{2A} a un effet inhibiteur sur la recapture du glutamate (Matos et al., 2012, 2013). Le RA_{2B} pourrait être impliqué dans la régulation de la production de glycogène (Allaman et al., 2003) alors que le RA₃, avec le RA₁, un rôle cytoprotecteur en conditions hypoxiques (Björklund et al., 2008).

4.2.2.2.4.2. Récepteurs P2

Les astrocytes expriment également les récepteurs canaux à l'ATP P2X. Les sous unités P2X exprimées par les astrocytes diffèrent selon les structures (Franke et al., 2001; Lalo et al., 2008). Dans l'hippocampe, les P2X1-4, 6 et 7 ont été détectés par immunocytochimie (Kukley et al., 2001) cependant les enregistrements électrophysiologiques n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de courants liés à ces récepteurs (Jabs et al., 2007). Le récepteur P2X7 a une sensibilité à l'ATP très faible et ne peut être activé que lorsque la concentration d'ATP extracellulaire n'est plus physiologique (Oliveira et al., 2011). Son activation P2X7 peut être interprétée comme un signal d'alarme pour les astrocytes, il est impliqué dans l'initiation de l'apoptose et dans le contrôle de la réactivité astrocytaire (Franke et al., 2012).

Les astrocytes expriment aussi les récepteurs P2Y (Kastritsis et al., 1992). Dans l'hippocampe les récepteurs P2Y1 2 et 4 sont détectés. Ils ont la même voie de signalisation que les « P2Y1 like »

neuronaux et induisent une libération de Ca^{2+} intracellulaire via l'activation de la PLC et la production d'IP3 (Bernstein et al., 1998). Les récepteurs P2Y1 et 2 sont impliqués dans la propagation des vagues calciques astrocytaires (Bennett et al., 2006; Bowser & Khakh, 2007).

Les récepteur purinergiques sont présent également au niveau des autres cellules gliales. L'adénosine par exemple peut moduler la maturation des oligodendrocyte (Coppi et al., 2013) ou la motilité de la microglie (Orr et al., 2009).

4.2.2.3. Physiopathologie de la transmission purinergique

La plupart d'entre nous ont déjà fait l'expérience des conséquences d'une interaction pharmacologique avec leur signalisation purinergique. En effet le café contient de la caféine qui est la substance psychoactive la plus consommée au monde. Son mécanisme d'action à des doses non toxiques est l'antagonisme non spécifique des récepteurs de l'adénosine (Fredholm et al., 1999) en particulier dans le cerveau, étant donné que la caféine est capable de passer la barrière hémato-encéphalique (Lopes et al., 2019). Ainsi, les effets sur le SNC résultant de la prise de café, conduisent à une augmentation de la vigilance, une diminution de la fatigue, une diminution du temps de réaction, une altération de l'humeur (Childs & de Wit, 2006). Cela image l'impact d'une régulation via l'adénosine dans le cerveau.

Des études ont été menées pour comprendre les mécanismes physiologiques qui sous-tendent les effets de la consommation de café. Ces effets pourraient notamment être dû à un effet de la caféine à la fois sur les récepteurs A_1 et A_{2A} (Fredholm, 1995). En effet les conséquences d'un apport en caféine à l'échelle de la transmission synaptique sont une augmentation de la transmission de base due au blocage des récepteurs A_1 et une diminution de la LTP liée au blocage des A_{2A} (Lopes et al., 2019).

D'une manière plus générale des études comportementales ont permis de mettre en évidence l'importance de la modulation purinergique dans l'apprentissage et la mémoire (Simões et al., 2016; Zhang et al., 2020), le cycle de veille/sommeil (Donlea et al., 2017; Lazarus et al., 2019), le contrôle de la prise alimentaire (Kola et al., 2008), les fonctions motrices (Mori, 2020), la douleur (Vincenzi et al., 2020) et le vieillissement (Costenla et al., 2011).

Un déficit de la signalisation purinergique joue un rôle dans plusieurs maladies neurodégénérative. maladie de Parkinson (Ongini & Fredholm, 1996), la maladie d'Alzheimer (Cellai et al., 2018), la sclérose latérale amyotrophique (Ng et al., 2015), la maladie de Huntington (Lee & Chern, 2014). De plus, elle est également impliqué dans l'ischémie (Pereira-Figueiredo et al., 2021), les AVC (Williams-Karnesky & Stenzel-Poore, 2009) et l'épilepsie (Tescarollo et al., 2020).

4.3. Rôle de la D-sérine astrocytaire

Comme nous l'avons vu les purines jouent un rôle clé dans la régulation de la transmission. Cependant ce ne sont pas les seuls gliotransmetteurs. Un autre transmetteur glial important est la D-sérine qui est essentielle pour la plasticité synaptique à long terme.

La sérine est un acide aminé qui est l'un des constituants les plus abondants des protéines. Elle est synthétisée à partir du 3-Phosphoglycérate, un produit intermédiaire de la glycolyse. La serine, qui entre dans la constitution des protéines, est produite sous sa forme lévogyre (L-sérine). Elle est impliquée dans la transmission sous sa forme dextrogyre (D-sérine). La D-Sérine est synthétisée à partir de la L-serine par l'enzyme sérine racémase (Wolosker et al., 1999). Sa structure est proche de celle de la glycine, elle peut d'ailleurs faire office de précurseur à sa synthèse par l'intermédiaire de l'enzyme hydroxyméthyltransférase. La D-serine joue un rôle dans la neurotransmission par son action sur les RNMDA.

Dans les années 1980, une étude a mis en évidence que la D-sérine ou la glycine était nécessaire au fonctionnement du RNMDA (Kleckner & Dingledine, 1988). En effet, comme je l'ai déjà évoqué, le RNMDA a la particularité de posséder deux sites de liaison distincts : l'un pour son agoniste principal qui est le glutamate, l'autre pour un co-agoniste appelé site glycine. Ce co-agoniste peut être soit la glycine soit la D-serine et sa présence est nécessaire à l'activation du récepteur (Kemp et al., 1988). L'importance de la glycine en tant que co-agoniste est mal connue *in vivo*. En conditions physiologiques dans l'hippocampe, le principal ligand endogène du site glycine des RNMDA synaptiques semble être la D-serine (Mothet et al., 2000; Papouin et al., 2012). D'ailleurs, la délétion génétique de la serine racémase affecte la transmission NMDA (Basu et al., 2009). En revanche, il semblerait que les RNMDA extra-synaptiques aient la glycine pour co-agoniste (Papouin et al., 2012). De fait, la présence de D-sérine lors de la transmission synaptique est requise pour l'induction de plasticité dépendante du RNMDA (Mothet et al., 2000; Panatier et al., 2006).

Dans les années 2000, plusieurs études ont démontré que la D-serine responsable de l'activation des RNMDA provient des astrocytes (Mothet et al., 2006; Panatier et al., 2006; Yang et al., 2003). Cette découverte met en évidence un important levier de contrôle sur la plasticité neuronale pour ces cellules gliales. Cela a d'ailleurs été démontré un peu plus tard par une étude de Henneberger et al. qui a mis en évidence que la libération de D-serine astrocytaire est nécessaire à l'induction de la LTP (Henneberger et al., 2010).

Une hypothèse alternative proposant une origine neuronale de la D-serine a ouvert un débat dans le domaine. En effet, la sérine racémase qui a initialement été décrite comme une enzyme astrocytaire (Wolosker et al., 1999) a par la suite été détectée dans les neurones (Miya et al., 2008).

Consécutivement à cette découverte, certaines expériences ont suggéré que la D-serine pourrait également être libérée par les neurones (Rosenberg et al., 2010, 2013), via le transporteur aux acides aminés Acs-1 (« Alanine-serine-cysteine transporter-1 ») qui a de l'affinité pour la glycine et la D-sérine (Mesuret et al., 2018). Ces résultats sont surprenants car ce transporteur est principalement connu pour être impliqué dans la recapture de la D-serine (Rutter et al., 2007). De plus, une étude récente montre que la serine racémase neuronale serait postsynaptique ce qui a conduit les auteurs à proposer une fonction de signalisation autocrine de la D-serine (Wong et al., 2020). Aujourd'hui il n'existe toujours pas de certitude sur la nature (glycine ou D-sérine) et l'origine (neuronale ou astrocytaire) du co-agoniste du RNMDA mais il est probable que cela dépende du type de synapse, du stade développemental, de la nature des RNMDA (synaptiques ou extrasynaptiques) et même de l'activité synaptique (Sherwood et al., 2021b).

Chapitre 2 : L'astrocyte est impliqué dans la dérégulation de la transmission en conditions pathologiques

Dans cette seconde partie, j'ai étudié la régulation de la transmission synaptique dans le cas du syndrome de Down. Je vais très brièvement décrire le fonctionnement des astrocytes en conditions pathologiques dans le cerveau. J'introduirai ensuite le syndrome de Down et les déficits de plasticité synaptique associés, en particulier ceux liés au système endocannabinoïdes qui nous intéresse dans cette étude. J'aborderai également l'implication des astrocytes dans cette pathologie afin de discuter de leur possible implication dans les mécanismes étudiés.

1. L'astrocyte en conditions pathologiques

1.1. Réactivité astrocytaire

De la même manière que les microglies, les astrocytes peuvent devenir « réactifs » en conditions pathologiques que ce soit en réponse à une lésion ou à une maladie. La réactivité astrocytaire se traduit par un ensemble de changements au niveau moléculaire et fonctionnel. L'une des caractéristiques de la réactivité astrocytaire est une hypertrophie de la cellule couplée à une augmentation de l'expression des filaments intermédiaires, notamment la GFAP, la vimentine et la nestine (Pekny & Nilsson, 2005).

Une meilleure compréhension des processus de réactivité astrocytaire a permis de montrer que celle-ci ne désigne pas un état unique mais qu'il y a une gradation des changements ayant lieu dans l'astrocyte qui dépend de la gravité de la maladie ou lésion qui affecte le SNC (Anderson et al., 2014; Clément et al., 2020). L'expression de la GFAP est plus ou moins proportionnelle au degré de réactivité.

(Anderson et al., 2014). On distingue généralement une réactivité modérée d'une réactivité sévère cependant il existe des formes intermédiaires et la limite entre les deux est relativement arbitraire (Clément et al., 2020).

La réactivité modérée est généralement provoquée par un traumatisme léger ou par une activation immunitaire diffuse liée à une infection virale ou bactérienne systémique. Elle se cantonne à des modulations réversibles de l'expression de certains gènes et à une hypertrophie du corps cellulaire et des prolongements principaux, sans que cela induise une prolifération des astrocytes (Anderson et al., 2014; Sofroniew, 2009). Les domaines astrocytaires sont préservés et restent globalement mutuellement exclusifs (Wilhelmsson et al., 2006).

La réactivité sévère provoque d'importants changements de l'expression génétique avec notamment une forte augmentation de l'expression de la GFAP. Elle se traduit également par une hypertrophie cellulaire et une prolifération des astrocytes qui conduit à une disparition des domaines astrocytaires exclusifs (Sofroniew & Vinters, 2010).

Le panel de gènes dont l'expression est modifiée peut être très variable en fonction des circonstances qui provoquent la réactivité astrocytaire (Zamanian et al., 2012).

1.2. Impact du changement d'état de l'astrocyte sur la transmission synaptique

Les conséquences de la réactivité astrocytaire sur la transmission sont difficiles à appréhender. En effet, comme nous l'avons vu, la réactivité astrocytaire n'est pas un phénomène tout-ou-rien et il en existe de nombreuses formes différentes. En fonction du stade de réactivité de l'astrocyte, l'impact sur sa signalisation calcique et sa façon de moduler la transmission sera différent. Les gènes codant pour les récepteurs membranaires sont concernés par les modifications d'expression. La plupart d'entre eux sont sous-exprimés lors de la réactivité astrocytaire (Hamby et al., 2012).

2. Le cas du Syndrome de Down

2.1. La pathologie

Le syndrome de Down (SD), ou trisomie 21, est une anomalie chromosomique congénitale due à la présence d'une troisième copie du chromosome 21 dans l'ensemble des cellules de l'organisme. Il s'agit de la cause génétique de déficience intellectuelle la plus fréquente (Dierssen, 2012). Cette pathologie a été caractérisée sur le plan clinique par John Langdon Down en 1866 (Patterson & Costa, 2005). Un siècle plus tard, la cause génétique de ces symptômes sera identifiée par des médecins français qui mettent en évidence la trisomie du chromosome 21 humain (Hsa21) (Lejeune et al., 1959). Dans la grande majorité des cas, la présence d'une copie supplémentaire du Hsa21 est causée par la

non-disjonction des chromosomes lors de la phase de méiose I ou II de la cellule œuf. Dans de rares cas, il peut y avoir une trisomie dite mosaïque, qui se produit dans une sous population de cellules seulement. Cela est dû à un accident de division lors d'une mitose et concerne environ 1% des cas de SD. Dans ce cas, le nombre de cellules affectées varie selon le stade de division auquel a eu lieu l'accident. Il existe aussi le cas des translocations robertsoniennes pour lesquelles une partie seulement du Hsa21 est excédentaire. Cet événement arrive lorsque le bras long d'un Hsa21 est transloqué sur un autre chromosome et concerne environ 4% des patients (Patterson, 2009).

2.1.1. Epidémiologie

Selon la base de données EUROCAT, le SD a une prévalence d'environ 2 pour 1000 naissances en Europe (Joint Research Centre (European Commission) et al., 2019). Le facteur de risque principal est un âge avancé de la mère. En effet, le risque de non-disjonction des Hsa21 lors de la méiose augmente de manière importante lorsque la mère a plus de 40 ans (Allen et al., 2009). La prévalence est inférieure à 1/1000 lorsque la mère a 25 ans alors qu'elle est d'environ 20/1000 lorsqu'elle a 45 ans (Morris et al., 2002). D'autres facteurs peuvent entrer en compte comme par exemple un court intervalle de temps entre deux grossesses (Morris et al., 2005), une exposition à des produits tératogènes, une consommation excessive d'alcool et de tabac par les parents ou encore une maladie de la mère (Malini & Ramachandra, 2007). La prévalence varie selon les pays et elle est également fortement influencée par l'accès au dépistage qui permet de réaliser une interruption de grossesse pour anomalie fœtale (Joint Research Centre (European Commission) et al., 2019).

2.1.2. Symptômes cognitifs

La copie supplémentaire du Hsa21 se retrouvant dans toutes les cellules, l'expression phénotypique du syndrome peut impliquer de nombreux organes. Le diagnostic clinique peut être très variable d'un individu à l'autre mais certaines caractéristiques sont communes à l'ensemble des individus atteints : une malformation craniofaciale, une hypotonie musculaire et des troubles cognitifs. Les autres signes cliniques très fréquents sont une malformation cardiaque, des troubles gastro-intestinaux, des déficits visuels et auditifs et une infertilité qui touche principalement les hommes (Berk et al., 1996; Liu et al., 2015; Stefanidis et al., 2011). De plus, le Down syndrome est associé à l'apparition précoce de pathologies de type Alzheimer avec la formation de plaques amyloïdes β (Leverenz & Raskind, 1998).

Le développement du système nerveux est perturbé chez les individus SD (Haydar & Reeves, 2012). En conséquence, ils présentent une microcéphalie accompagnée de problèmes structurels dans le cerveau et d'un déséquilibre dans l'expression des types cellulaires. Les troubles cognitifs associés

se manifestent par un QI inférieur à la norme et une altération globale de la mémoire (Godfrey & Lee, 2018). Il n'existe pas de traitement thérapeutique pour améliorer les symptômes cognitifs du SD à ce jour.

2.1.3. Modèles

Plusieurs modèles expérimentaux ont été mis en place pour pouvoir étudier le fonctionnement du système nerveux dans le SD. Les principaux modèles développés sont les cultures de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) qui dérivent de fibroblastes d'humains SD et les lignées de souris transgéniques sur-exprimant les gènes équivalents à ceux du chromosome 21 humain.

2.1.3.1. Cellules souches pluripotentes induites

La technique des CSPi consiste à produire des cellules souches pluripotentes par dédifférenciation de cellules différenciées. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de travailler sur du matériel humain sans être trop invasive. Par exemple, on peut former une culture de neurones ou d'astrocytes à partir d'un prélèvement de fibroblastes de la peau. Le processus de dédifférenciation cellulaire se fait grâce à l'application du cocktail de Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006). Ce mélange de 4 facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, KLF4, et c-Myc) porte le nom de Shinya Yamanaka, l'un des inventeurs de la technique de CSPi qui lui a valu le prix Nobel de Physiologie et Médecine 2012 conjointement avec John Gurdon.

Des modèles CSPi de SD ont été développés à partir de prélèvement sur des humains SD, soit à partir de cellules embryonnaires (Park et al., 2008), soit à partir de fibroblastes d'individus adultes (Murray et al., 2015). Ces modèles développés récemment ont permis de mieux comprendre l'impact de la trisomie 21 à l'échelle de la cellule et de mettre en avant des déficits dans le fonctionnement des neurones, des astrocytes et de leurs interactions (Chen et al., 2014; Huo et al., 2018; Mizuno et al., 2018; Murray et al., 2015). Ces modèles présentent un nouvel outil précieux pour la compréhension du SD ainsi que de nombreuses pathologies. Cependant, les cultures de CSPi ne permettent pas d'étudier la pathologie à l'échelle d'une structure cérébrale, du cerveau ou même de l'organisme. Ainsi, le recours aux modèles animaux est nécessaire pour étudier le développement du cerveau, la plasticité dans le réseau et la mémoire.

2.1.3.2. Souris transgéniques

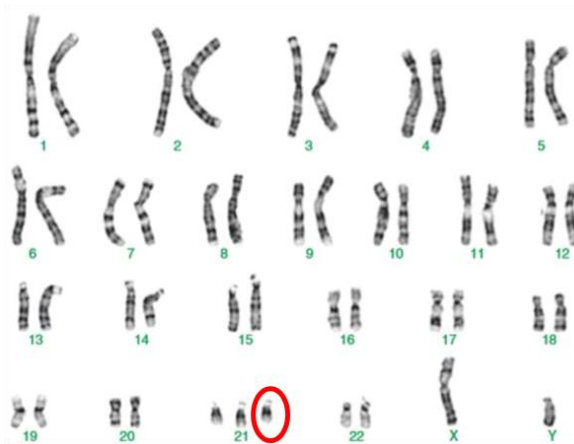
Plusieurs stratégies ont été mises en place pour créer des animaux transgéniques SD. En effet, même si 90% des génomes murins et humains sont des séquences conservées communes et que 99% des gènes de la souris ont leur homologue humain, les différentes recombinaisons au cours de

l'évolution ont conduit à une réorganisation des chromosomes (Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Ainsi, la souris ne possède pas de chromosome équivalent au Hsa21. Les 2/3 des gènes correspondants à ceux du Hsa21 se trouvent sur le chromosome 16 de la souris (Mmu16) et les autres sont distribués sur les Mmu10 et Mmu17 (Nelson & Gibbs, 2004).

L'une des stratégies utilisée est d'induire une aneuploïdie trans-espèce en ajoutant le Hsa21 (trans-chromosome) en libre ségrégation au génome de la souris. Le principal modèle utilisant cette technique est baptisé Tc1. Il présente l'avantage de reproduire une trisomie pour l'ensemble des gènes du Hsa1 et uniquement ceux-ci (O'Doherty et al., 2005). Cependant, le Hsa1 peut être perdu de manière aléatoire au cours du développement ce qui conduit donc à une expression mosaïque des gènes du chromosome (O'Doherty et al., 2005; Yu et al., 2010). De plus, bien que les gènes soient orthologues, ils ne sont pas tous identiques et il peut y avoir des différences entre l'humain et la souris au niveau de la séquence des gènes, de la régulation de leur transcription et de la conformation des protéines.

Une méthode alternative consiste à réaliser une trisomie partielle des fragments de chromosomes murins homologues aux parties du Hsa21. Le modèle le plus utilisé est le Ts65Dn. Il consiste à induire une translocation d'une partie du Mmu16 sur le centromère du Mmu17 (Davisson et al., 1993; Patterson & Costa, 2005). Cela permet la formation d'un chromosome excédentaire comprenant la partie du Mmu16 homologue au Hsa21 ainsi que qu'une petite partie du Mmu17 (Akeson et al., 2001; Reeves et al., 1995). Au final, le chromosome Ts65Dn exprime plus de 50% des gènes orthologues à ceux du Hsa21, soit environ 136 gènes (Cramer & Galdzicki, 2012; Kahlem et al., 2004).

A. Caryotype d'un homme atteint du syndrome de Down



B. Caryotype d'une souris femelle Ts65Dn

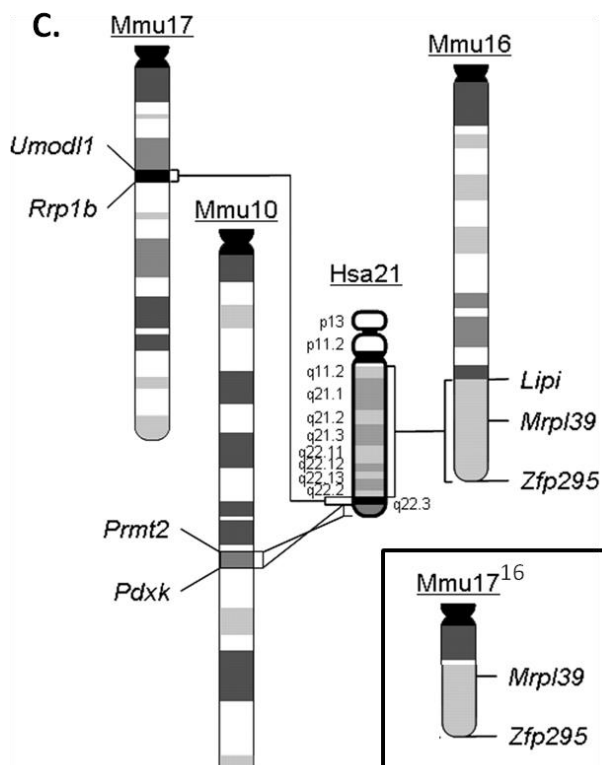
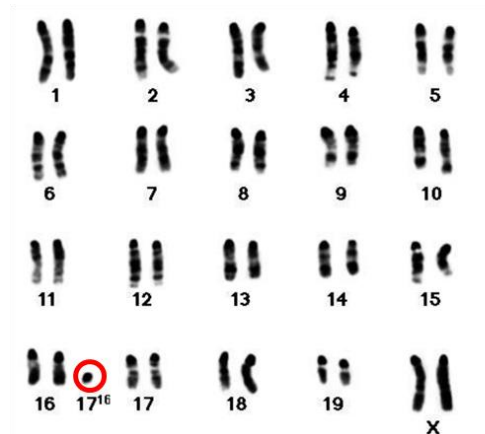


Figure 10 : Les souris Ts65Dn sont trisomiques pour plus de 50% des gènes orthologues au Hsa21.

A. Caryotype d'un patient de sexe masculin atteint du syndrome de Down, l'individu présente un Hsa21 excédentaire. Tiré de Gartika et al., 2018. **B.** Caryotype d'une souris Ts65Dn femelle présentant un chromosome Mmu17¹⁶ en plus des deux Mmu16 normaux. **C.** Représentation schématique du Hsa21 et des régions homologues sur les Mmu10, Mmu16 et Mmu17. L'encart représente le Mmu17¹⁶ exprimé par les souris Ts65Dn. Il comprend le centromère du Mmu17 associé à un fragment du Mmu16. Schéma modifié d'après Yu et al., 2010.

Les souris Ts65Dn présentent des caractéristiques physiques, comportementales et neurologiques du SD. On retrouve notamment une dysmorphie craniofaciale et des déficits d'apprentissage et de mémoire (Hyde & Crnic, 2001; Patterson & Costa, 2005; Richtsmeier et al., 2002).

2.2. Les altérations de transmission et de la plasticité synaptique

Le mauvais développement du SNC chez les individus SD a des conséquences anatomiques, morphologiques et fonctionnelles visibles à plusieurs échelles. La microcéphalie est associée à un nombre réduit de neurones (Ross et al., 1984), pouvant s'expliquer par une réduction de la prolifération des cellules précurseurs et par une apoptose plus importante (Contestabile et al., 2007; Guidi et al., 2008). En conséquence, le volume de l'hippocampe est plus faible à la naissance et celui-ci continue de décroître au cours de la vie (Teipel et al., 2003). Sur le plan morphologique, il y a des altérations à l'échelle des structures cérébrales comme par exemple, une désorganisation des couches corticales. A l'échelle des cellules, les neurones présentent une atrophie des dendrites qui ont moins de ramifications et moins d'épines dendritiques (Becker et al., 1986). Cela se traduit également par une synaptogénèse altérée (Becker et al., 1991).

Au niveau fonctionnel, les études de la plasticité synaptique chez l'humain ne sont pas nombreuses car il existe peu de moyens d'étude non invasifs. Il a toutefois été démontré que la plasticité pouvait être altérée au niveau du cortex, les patients présentant une plasticité analogue à la LTP réduite (Battaglia et al., 2008). Des études utilisant l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle montre que des patterns d'activation des neurones sont anormaux chez les individus SD (Jacola et al., 2011; Losin et al., 2009).

Les souris transgéniques Ts65Dn présentent une altération de la LTP dans l'hippocampe, ce qui est cohérent avec les observations faites chez les patients (Costa & Grybko, 2005; Kleschevnikov et al., 2004; Siarey et al., 1997).

2.3. Altération du système endocannabinoïde dans le SD

Le système endocannabinoïdes est un important système de régulation de la transmission synaptique. Or, il s'avère que la plasticité synaptique est impactée par sa dérégulation dans le SD.

Ce système fonctionne principalement de manière rétrograde, les ligands anandamide (AEA) et 2-arachidonoylglycerol (2-AG) étant synthétisés au niveau postsynaptique et agissant sur les récepteurs aux endocannabinoïdes de type 1 (CB1) et 2 (CB2) présynaptiques et astrocytaires (Marsicano & Lafenêtre, 2009). La signalisation via le récepteur CB1 joue un rôle important dans l'induction de la LTP et la formation de la mémoire (Busquets-Garcia et al., 2015; Marsicano & Lafenêtre, 2009; Monory et al., 2015). Or, l'activité du système endocannabinoïde et en particulier du CB1 est augmentée dans le

cas du SD, ce qui pourrait expliquer une partie des déficits de plasticité présents dans ce syndrome (Lysenko et al., 2014; Navarro-Romero et al., 2019). En effet, le blocage des CB1 semble bénéfique pour la mémoire et la plasticité chez les animaux SD (Navarro-Romero et al., 2019).

2.4. Implication des astrocytes dans le SD

L'implication des cellules gliales dans les déficits cognitifs du SD a été peu étudiée. Pourtant, leur fonctionnement est également altéré. Comparativement aux neurones, les astrocytes sont surexprimés dans le SD. Cela serait dû à plusieurs facteurs, comme par exemple le basculement plus précoce de la neurogénèse à la gliogénèse (Briggs et al., 2013). De plus, au cours du développement postnatal il y aurait une dérégulation de la glie NG2, précurseur des oligodendrocytes. Cela entraînerait une surproduction d'astrocytes au détriment des oligodendrocytes (Reiche et al., 2019).

Les astrocytes SD surexpriment la GFAP et le S100 β qui se situe sur le Hsa21. Ils ont un profil réactif et libèrent de l'oxyde nitrique et du S100 β de manière accrue. La libération de 100 β pourrait avoir des effets délétères sur les neurones et être l'une des causes de l'inhibition de la prolifération neuronale (Chen et al., 2014). De plus, une étude utilisant des CSPi de SD a mis en évidence que les astrocytes présentaient une activité calcique anormalement soutenue (Mizuno et al., 2018). Celle-ci a pour conséquence une inhibition de la transmission neuronale qui serait provoquée par les purines astrocytaires agissant sur les récepteurs A₁ des neurones.

Chapitre 3 : Objectifs de l'étude

L'objectif global de ma thèse est d'étudier comment la transmission synaptique est régulée dans l'hippocampe à l'âge adulte.

Dans une première partie, mon objectif était de mieux comprendre le rôle de l'astrocyte dans la régulation de la transmission synaptique de base. Depuis l'émergence du concept de la synapse tripartite il y a une trentaine d'années, de nombreux travaux ont permis d'améliorer nos connaissances sur la fonction de ce troisième élément, l'élément astrocytaire au cours de la transmission synaptique (Araque et al., 1999). Des travaux récents indiquent que les astrocytes ne sont pas seulement activés par une activité neuronale soutenue mais sont aussi capables de détecter et de réguler la transmission à l'échelle d'une synapse unique (Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011).

Cependant beaucoup d'interrogations demeurent. Pour des raisons techniques, la majorité des études électrophysiologiques ont été réalisées chez le rat ou la souris « juvénile » (D'Ascenzo et al., 2007; Fiocco & McCarthy, 2004; Panatier et al., 2011). Dès lors, qu'en est-il à l'âge adulte ? De plus, l'organisation des astrocytes en territoires uniques ou « domaines » suggère que l'astrocyte est

capable d'intégrer et de coordonner l'activité synaptique à l'échelle de synapses voisines appartenant à plusieurs neurones. Est-ce le cas ?

Chez le rat juvénile, à l'échelle d'une synapse, l'astrocyte 1) détecte le glutamate libéré au niveau d'une seule synapse suite à l'arrivée d'un potentiel d'action via le récepteur mGluR5 et en retour 2) facilite l'efficacité de la transmission en augmentant la probabilité de libération via la libération de purines et l'activation subséquente des récepteurs présynaptiques à l'adénosine de type A_{2A} (Panatier et al., 2011). Dans la continuité de cette étude, les travaux réalisés que j'ai réalisés au cours de ma thèse dans la région CA1 de l'hippocampe de rats adultes visent à déterminer :

- (1) Si l'astrocyte à l'âge adulte est toujours capable de réguler l'efficacité de la transmission synaptique de base à l'échelle de la synapse unique via l'activation des récepteurs mGluR5 astrocytaires et A_{2A} présynaptiques.
- (2) Si la régulation de la neurotransmission par l'astrocyte dépend du niveau d'activité neuronale.
- (3) Si cette régulation dépend de l'interaction du mGluR5 astrocytaire avec Homer 1b/c.
- (4) Si cette régulation a un impact sur l'induction de la plasticité synaptique à long terme (étude préliminaire).

Dans une seconde partie, j'ai étudié la plasticité synaptique à long terme et son altération dans le contexte du syndrome de Down (SD). Le SD, ou trisomie 21, est la cause génétique la plus courante de déficience intellectuelle. Les patients SD présentent des déficits de mémoire et de plasticité synaptique qui se retrouvent sur les modèles animaux de SD (Cramer & Galdzicki, 2012). Des études récentes ont montré qu'une « hyper-activation » du récepteur aux endocannabinoïdes de type 1 (CB1) est impliquée dans les déficits de plasticité (Lysenko et al., 2014; Navarro-Romero et al., 2019). De plus, la production de prégnénolone, un précurseur hormonal ayant un effet antagoniste sur le CB1, est aussi altérée dans le SD (Tomaselli & Vallée, 2019). Suite à ces découvertes récentes, la prégnénolone pourrait être envisagée comme candidat pour un traitement thérapeutique du SD.

Les travaux que j'ai réalisés ont pour objectif de déterminer si la prégnénolone peut, via une action inhibitrice sur le récepteur CB1, compenser les déficits de plasticité à long terme observés dans le SD.

Résultats

Etude n°1: Astrocytic control of basal synaptic transmission is activity dependent.

Contexte de l'étude

Les astrocytes sont connus pour détecter et réguler la transmission synaptique lorsque l'activité dans le réseau est soutenue (Araque et al., 2014; Zhang et al., 2003). Dans ces conditions ils libèrent notamment des purines afin de réguler l'efficacité de la transmission synaptique (Pascual et al., 2005; Schmitt et al., 2012). Des travaux récents, réalisés chez le rat juvénile indiquent que les astrocytes sont également capables de détecter via le récepteur mGluR5 et de faciliter en retour l'efficacité de la transmission synaptique à l'échelle d'une seule synapse, suite à l'arrivée d'un seul potentiel d'action (Panatier et al., 2011). Alors, que l'on aurait pu penser qu'il en était de même à l'âge adulte, il s'avère que l'expression du mGluR5 diminue au cours du développement (Cai et al., 2000) remettant en question sa présence et son rôle à l'âge adulte (Sun et al., 2013). Cette étude vise donc à déterminer le rôle du mGluR5 astrocytaire dans la régulation de la transmission synaptique de base dans la région CA1 de l'hippocampe de rats adultes.

Résumé des résultats :

Dans un premier temps nous avons réalisé des expériences d'imagerie à haute résolution et d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) afin d'identifier la présence du mGluR5 et de son ARNm *Grm5* spécifiquement dans les astrocytes présents dans le *stratum radiatum* de la région CA1 de l'hippocampe.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques couplés à une approche pharmacologique afin de montrer que la voie de régulation mGluR5 astrocytaire – A_{2A} présynaptique était toujours présente à l'âge adulte. Pour se faire nous avons réalisé des enregistrements d'événements miniatures et évoqués. Afin d'enregistrer l'activité ayant lieu au niveau de synapses voisines appartenant à plusieurs neurones nous avons également réalisé des enregistrements extracellulaires de potentiels de champs excitateurs. De manière intéressante, cette voie de régulation mGluR5 - A_{2A} est toujours présente lorsque le nombre de synapses activées est faible. En revanche, lorsque l'activité dans le réseau est plus forte cette régulation n'est plus visible.

Enfin, afin de valider que cette régulation dépend de l'interaction du mGluR5 astrocytaire avec les protéines d'échafaudages homer1b/c astrocytaires, nous avons utilisé une approche virale afin d'exprimer un peptide mGluR5 dominant négatif dans les astrocytes. Cela nous a permis de mettre en évidence que l'effet observé était spécifiquement dû à une activation des mGluR5 astrocytaires et qu'elle dépendait de l'interaction du mGluR5 avec Homer 1b/c.

Contribution

Dans cette étude j'ai réalisé les enregistrements électrophysiologiques de potentiels de champs (Figure 4 et 5) conjointement avec Dylan Pommier et Muna Hillal. J'ai aussi réalisé les enregistrements de patch-clamp en configuration cellule entière sur des tranches aiguës provenant d'animaux injectés soit avec un virus contrôle ou alors avec un virus permettant l'expression du peptide mGluR5 (Figures 7 et 8). J'ai également effectué d'autres expériences afin 1) de tester l'impact des récepteurs mGluR5 astrocytaires dans la libération des purines impliquées dans l'activation des récepteurs P2X post-synaptiques 2) de tester leur impact sur l'induction de la plasticité à long terme. Ces résultats n'apparaissent pas dans l'article et sont présentés à la suite de celui-ci.

Astrocytic control of basal synaptic transmission is activity dependent

Dorian Arnouil^{1*}, Dylan Pommier^{1*}, Muna Hillal^{1*}, Valentin Langlais¹, Aurélie Amadio¹, Marie Miegebielle¹, Sébastien Marais², Charlène Joséphine^{3,4}, Vincent Simon¹, Astrid Cannich¹, Marjorie Varilh¹, Julien Bourel¹, Carole Escartin^{3,4}, Alexis Bemelmans^{3,4}, Daniela Cota¹, Giovanni Marsicano¹, Philippe Ciofi¹, Stéphane Olié¹, Aude Panatier¹

¹Univ. Bordeaux, INSERM, Neurocentre Magendie, U1215, F-33000 Bordeaux, France

²Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, Bordeaux Imaging Center, BIC, UMS 3420, US 4, F-33000 Bordeaux, France

³CEA, Institut de Biologie François Jacop, MIRCen, Fontenay-aux-Roses, France

⁴CNRS, Université de Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France

*Co-first authors

Equal contribution

Abbreviated title: Astrocytes upregulate adult basal synaptic transmission

Words in Abstract, Introduction, Discussion

Correspondence to:

Dr. Aude Panatier

Email: aude.panatier@inserm.fr

Key words: astrocyte, domain, gliotransmission, mGluR5, basal synaptic transmission

Conflict of interest statement: “The authors declare no competing financial interests.”

Abstract

Data accumulated over the two last decades have demonstrated that astrocytes play key roles in the regulation of synaptic transmission and plasticity. This is due to their capability to detect and regulate synaptic transmission by expressing receptors and releasing gliotransmitters, respectively. Importantly, in juvenile rats, astrocytes are able to detect and in turn up-regulate basal synaptic transmission at the level of individual synapses. Whether this upregulation is still present in adult and whether it is affected by the synaptic activity occurring at neighboring synapses present within the astrocytic domain is unknown. Using STED imaging and fluorescence *in situ* hybridization on fixed tissue as well as electrophysiological recordings on acute hippocampal slices of adult male rats, we demonstrate that the upregulation pathway previously described in juvenile rats is also present in adult rats. More importantly, our data strongly suggest that an individual astrocyte can adapt its purine-mediated regulation of glutamatergic transmission as a function of the number of synapses activated in its domain. When the number of afferent inputs activated is small, astrocytes facilitate synaptic efficacy through a purine-mediated process. Interestingly, this process is no longer present when a higher number of afferences is activated, suggesting that astrocytes integrate the incoming information and adapt its response in relationship to the instantaneous network activity.

Introduction

While synaptic transmission depends on the communication between neuronal elements at synapses, accumulating data have shown that glial cells and in particular astrocytes play active roles as regulators. For a long time, it was assumed that astrocytes were active partners of neurons only under conditions of intense or sustained network activity (Araque et al., 2014; Fellin et al., 2004; Henneberger et al., 2010; Panatier et al., 2006; Pascual et al., 2005; Pasti et al., 1997; Serrano et al., 2006). This view has recently changed, as it has been demonstrated that fast local calcium events can be induced locally, *in vitro* and *in vivo*, at the level of astrocytic processes (Arizono et al., 2020; Bindocci et al., 2017; Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011; Stobart et al., 2018).

At hippocampal CA3-CA1 synapses of juvenile 3 weeks old rats, astrocytes are recruited during basal synaptic activity at the level of individual synapses (Panatier et al., 2011). We have shown that the activation of a single fiber, by a single pulse of stimulation, triggers local Ca^{2+} events in glial compartments, which are mediated by the activation of metabotropic glutamate receptors subtype 5 (mGluR5). In turn astrocytes upregulate the efficacy of transmission through the release of purines, which activate presynaptic adenosine $\text{A}_{2\text{A}}$ receptors ($\text{A}_{2\text{A}}\text{Rs}$) (Panatier et al., 2011).

The implication of mGluR5 in the detection of the synaptic signal by astrocytes has been clearly described (D'Ascenzo et al., 2007; Honsek et al., 2010; Latour et al., 2001; Panatier et al., 2011; Pasti et al., 1997; Porter and McCarthy, 1995; Porter and McCarthy, 1996; Sun et al., 2014; Wang et al., 2006). However, as other astrocytic proteins like GFAP and vimentin, the expression of mGluR5 is developmentally regulated and is decreasing drastically in adulthood (Cai et al., 2000; Sun et al., 2013). Therefore, the detection of glutamatergic synaptic activity through mGluR5 in adult rodents has been challenged (Sun et al., 2013). However, it has been shown that whiskers stimulation in adult mice induced Ca^{2+} events in astrocytes that were sensitive to MPEP, an antagonist of mGluR5 (Wang et al., 2006), suggesting the involvement

of this receptor in astroglial functions at adulthood. In addition, application of group I mGluR agonist on acute hippocampal slices from adult mice induced Ca^{2+} events in astrocytes (Tang et al., 2015). Furthermore, it has been reported that mGluR5 as well as its scaffold protein Homer1b/c are expressed at P30 in mice (Buscemi et al., 2017). Finally using silver intensification of DAB, Laviale and collaborators have reported the presence of mGluR5 in the fine peripheral astrocytic processes of adult rats (Lavialle et al., 2011).

Altogether, these data indicate that, despite its lower level of expression, mGluR5 is functional in adult astrocytes, in a similar manner as during youth. However, it remains unknown whether astrocytes in adult rats upregulate basal synaptic transmission through the same mGluR5- A_2A R pathway we uncovered in juvenile rats. Importantly, this regulation has been described only at the level of individual synaptic sites in response to minimal stimulations, a protocol that activates a single afferent fiber (Panatier et al., 2011). Whether this regulation also occurs depending on the number of neighboring synapses activated is an open question. Indeed, it is important to notice that a single astrocyte is potentially able to regulate synaptic transmission at the level of around 100 000 neighboring synapses as each astrocyte occupy an exclusive territory called domain (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007).

Here we found that adult astrocytes up-regulate basal synaptic transmission at CA3-CA1 synapses at the level of individual glutamatergic synapse, in adult rats. Importantly, this regulation appears to be activity-dependent, because it only occurs when a small number of neighboring synapses were stimulated.

Materials and methods

Animals

All efforts were made to reduce any distress caused by the procedures in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE) and complying with the guidelines of INSERM and the local ethical comity of Bordeaux (22815). Experiments were performed using adult Wistar male rats (9 to 13 weeks old; Janvier, Le Genest Saint Isle

- France). Animals were housed in collective cages under a 12 h light/dark cycle and controlled temperature (22 ± 2 °C) and humidity (50 ± 10 %) with ad libitum access to water and food.

Viruses

To study the function of astrocytic mGluR5 we took advantage of two peptides, namely the mGluR5 C-tail decoy peptide (PPSPFR) and a control peptide with a dual point mutation in the binding motif rendering it incapable of binding Homer (PLSPRR) that were developed (Mao et al., 2005) and used previously (Mao et al., 2005; O’Riordan et al., 2014; Ronesi et al., 2012; Ronesi and Huber, 2008; Tronson et al., 2010). This time, to prevent the diffusion of the peptide, the Tat sequence was omitted, and the Tag RFP ORF was fused in the N-terminal part of the peptides. The genes of interest were then inserted in an adeno-associated virus shuttle plasmid that bear the gfaABC1D promoter, a synthetic promoter derived from the GFAP promoter (Ceyzeriat et al., 2018; Lee et al., 2008). Recombinant AAV9 particles were generated by transient co-transfection of HEK-293T cells with a three plasmid system as previously described (Berger et al., 2015). Briefly, 3 days following transfection, viral particles were extracted from cell supernatant and cell lysate, concentrated by PEG precipitation, purified by ultracentrifugation on an Iodixaniol step-gradient, and desalted and concentrated by tangential ultrafiltration. The resulting rAAV vector batches were stored at 4 °C until further use. rAAV concentration was estimated by QPCR using a plasmid of known concentration for the standard curve, and expressed as genome content by mL (GC/mL).

Therefore, two viruses were used the AAV9-tag-RFP-mGluR5pep to express the mGluR5 C-tail decoy peptide mimicking the carboxy-terminal tail of mGluR5 and the AAV9-tag-RFP-Mutpep to express the control peptide with a dual point mutation in astrocytes.

Stereotaxic injection

In vivo stereotaxic injections were performed in the CA1 area of the hippocampus of 4 weeks old male Wistar rats. During the entire procedure, each rat was anaesthetized with isoflurane

(induction at 4 % + air 2 L/min, maintenance at 2 % + air 0.4 L/min) and placed on a heating pad at 38 °C to maintain a stable body temperature. A subcutaneous injection of Meloxicam (1 mg/Kg) was performed. Local anesthesia was performed using subcutaneous injection of lidocaine 0.5 % (maximum 490 µL for a rat of 350g) before incision of the skull skin. Then a skin incision was performed and a hole was drilled in the skull to inject in each hemisphere 1 µL of viral suspension with a Hamilton syringe at 0.2 µL/min. Viral vectors were injected in the CA1 region of the hippocampus (coordinates from Bregma: antero-posterior (AP): - 2.8; lateral (L): +/- 1.9; ventral(V): - 2.6 mm from the dura; or more caudally as it improves viral diffusion AP: -3, L: +/- 3; V: -1.5 mm). AAV were diluted in phosphate buffer saline 1X (phosphate buffer saline with 1.6 mM KH₂PO₄, 3 mM Na₂HPO₄, 2H₂O, 154 mM NaCl; pH 7.4) with 0.001 % pluronic acid, at a final total concentration of 1 10¹³ viral genome (VG)/µL. The syringe was left in place for 5 min following each injection to minimize back flow of viral solution. After the injection, the skin was sutured using an ETHILON non-absorbable 5.0 thread mounted on a 16 mm T-tip needle and the rat was placed in a post-operative recovery chamber maintained at 30 °C. Rats were monitored until they wake up then put back in a collective box enriched with lab 'nest.

Slice preparation

Transverse and coronal hippocampal slices (350 µm) were prepared as described previously (Panatier et al., 2011). Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (isoflurane 5 %, oxygen 100 %), decapitated and the brain was quickly excised and placed either in ice-cold cutting solution or artificial cerebrospinal fluid (ACSF) saturated with 95 % O₂ and 5 % CO₂. The cutting solution composition was (in mM): 120 Choline-Cl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 MgCl₂ and 0.6 CaCl₂ (pH 7.3-7.4; 296 mosmol/kg). The ACSF contained (in mM): 120 NaCl, 2.5KCl, 1.25NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.3MgCl₂, 2 CaCl₂, and 10 glucose (pH 7.3-7.4; 296mosmol/kg). A block of tissue containing the hippocampus was prepared and acute slices were cut on a vibratome (Microm HM605V or LEICA VT1200S). Slices were maintained at 32 °C for 30 min in ACSF (equilibrated with 95 % O₂ and 5 % CO₂) and then at room

temperature at least 1 h before and maximum 4 h being transferred to a recording chamber where they were perfused (3 mL/min) with ACSF at 31-32°C.

For animals that underwent virus injection: Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (IMALGENE® 1000; 167 mg/kg) and xylazine (ROMPUN®; 20 mg/kg). In order to better preserve tissues, the blood was removed by transcardial perfusion of ice-cold sucrose solution. The composition of the sucrose solution was composed (in mM): 180 Sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 20 Glucose, 7 MgCl₂ and 0.5 CaCl₂ (pH 7.3-7.4; 296 mosmol/kg). 150 mL of sucrose aCSF was perfused through the feeding needle at a rate of 70 mL/min. Then hippocampal slices were prepared as described above.

Electrophysiology

Hippocampal CA3-CA1 area was identified using infrared differential interference contrast microscopy (Olympus BX50WI microscope). For transfected brain slices, virus expression was visually assessed by looking at fluorescent cells in the CA1 *stratum radiatum* using a reflected fluorescence system (Olympus U-RFL-T) set on green excitation (illuminated with 120 W mercury vapor arc lamp coupled to U-MWIG2 filter). Synaptic events were evoked at 0.033 Hz by orthodromic stimulation (100 µs) of Schaffer collaterals using either a glass pipette (2-4 MΩ) pulled from borosilicate glass (1.5 mm o.d., 1.17 mm i.d., Harvard Apparatus) and filled with ACSF or a bipolar tungsten stimulating electrode, placed in the *stratum radiatum* more than 150 µm away from the recording electrode.

For patch-clamp experiments of pyramidal neurons, glass pipettes (5-7 MΩ) were filled with an internal solution containing (in mM): 125 CsMeSO₃, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Na₂CreatinePO₄, 0.1 spermine, 2 QX-314, 2 ATP, 0.4 GTP (pH 7.1-7.3 adjust with CsOH; 290-292 mosmol/kg). Excitatory post-synaptic miniature currents (mEPSCs) were recorded at -70 mV in voltage-clamp mode in the presence of picrotoxin (100 µM) in the perfused ACSF. Spontaneous unitary synaptic events (miniatures) were obtained in the presence of

tetrodotoxin (TTX, 0.5 μ M). Series resistance (10-25 M Ω) was monitored online and cells were excluded from data analysis if more than 15 % change occurred during the course of the experiment.

For minimal synaptic stimulations, EPSCs were evoked at 0.066 Hz (period of 15 s). The stimulus strength was adjusted at the beginning of each experiment to a value that yielded around 50 % successes. The failure rate (number of failures as percentage of total number of stimulations), average EPSCs amplitude (including failures), and EPSC potency (amplitude of EPSCs excluding failures) were calculated. Traces containing spontaneous EPSCs not temporally correlated with the stimulus and that interfered with baseline or peak measurements were not included in the analysis. After 10 min of baseline, drug (MPEP) was bath applied and recording was continued for 20 min. The last 10min were compared to baseline for quantification. An upward or downward trend in frequency or amplitude during baseline was an exclusion criterion.

For paired pulse stimulation experiments pairs of EPSCs were evoked 50ms apart, at a frequency of 0.066 Hz. The paired-pulse ratio (PPR) was calculated as the amplitude of the second EPSC over the amplitude of the first EPSC.

For patch-clamp experiments of astrocytes, astrocytes in the *stratum radiatum* were identified using infrared differential interference contrast microscopy based on soma size ($\leq 10 \mu$ m), shape, and biophysical properties. Astrocytes were characterized by performing a whole-cell current-voltage profile using a ramp voltage command from -100 to +100 mV (600 ms duration) in voltage-clamp mode, according to criteria in Panatier et al. (Panatier et al., 2011). Cells included in this study were characterized by a linear profile (in voltage-clamp mode), without action potentials (depolarizing steps in current-clamp mode). The resting membrane potential was recorded in current-clamp configuration during all the experiment. Whole cell patch-clamp recordings were performed using pipettes (5-7 M Ω) filled with a solution containing (in mM): 126 KMeSO₃, 4 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Na₂CreatinePO₄, 4 ATP, 0.4 GTP (pH 7.2 adjusted with KOH; 292 mosmol/kg). For experiments with BAPTAtetrapotassium (15 mM, Santa Cruz

Biotech) the concentration of KMeSO_3 was adjusted to 66 mM to maintain the concentration of potassium ions. To constrain free astrocytic Ca^{2+} , Ca^{2+} concentration was clamped to 50-80 nM, by complementing the internal solution with (in mM): 0.2 BAPTA (Tocris), 0.45 EGTA (Tocris) and 0.14 Ca^{2+} (Henneberger et al., 2010).

Field excitatory postsynaptic potential (fEPSPs) recording pipettes (3-4 M Ω) pulled from borosilicate glass and filled with ACSF were placed in the *stratum radiatum* of the CA1 area. fEPSPs were recorded in current-clamp mode ($I = 0$). In order to study basal synaptic transmission, fEPSPs were monitored at CA3-CA1 synapses in response to increasing stimulus strength. The amplitude of stimulation was incremented during the experiment, in order to recruit an increasing number of synapses (from a small number to a higher one). This procedure was used to build input/output (I/O) relationship. Paired fEPSPs were evoked 100 ms apart, at 0.033 Hz. The paired-pulse ratio was calculated as the slope of the second fEPSP over the slope of the first evoked fEPSP (paired-pulse ratio; PPR). A stable baseline was recorded for at least 20 min before starting the I/O experiment. The same amplitude of stimulation was applied 3 times (0.033 Hz), before being increased. Once the amplitude of fiber volley reached -0.07 mV (or -0.29 mV for experiments in Figure 5), the amplitude of stimulation used for the baseline was again applied during 10 minutes. If the fEPSP slope came back, the pharmacological drug (either antagonist or agonist) was applied for 15 minutes before the realization of the second I/O. Importantly, if the fEPSP slope didn't went back to the baseline the experiment was stopped. The group 0.01 mV corresponded to fEPSPs evoked when the amplitude of the fiber volley was smaller than -0.02 mV; the group 0.03 mV for fEPSPs evoked when the amplitude of the fiber volley was comprised between -0.02 and -0.039 mV; for the group 0.05 mV the fiber volley was comprised in between -0.04 and -0.059 mV; for the group 0.07 mV, the fiber volley was in between -0.06 and -0.079 mV; for the group 0.09 mV the fiber volley was in between -0.08 mV and -0.099 mV; for the group 0.15 mV the fiber volley was comprised in between -0.1 mV and -0.19 mV and finally the group 0.25 mV

corresponded to fEPSPs evoked when the amplitude of the fiber volley was comprised in between -0.2 mV and -0.29 mV.

All electrophysiological recordings were performed using a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments, Inc.). Signals were filtered at 2 kHz and digitized at 20 kHz via a Digidata1440. Data were analyzed off line using clampfit (Axon instrument, Inc) and Igor Pro 8 (Neuromatic, WaveMetrics).

Immunocytochemical procedures

Following our standard procedures (Israel et al., 2014) one 11-week-old and two 15-week-old male Wistar Han rats (Janvier Labs, 53940 Le Genest-Saint-Isle, France) were overdosed i.p. with a mixture of pentobarbital (200 mg/kg) and lidocaine (20 mg/kg), and perfused transaortically over 60 min with 50 mL saline followed by 800 mL of a cold mixture of 4 % paraformaldehyde in a 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4). The brains were dissected out and post-fixed overnight in the same fixative before cutting on a VTS1000S vibratome (Leica Biosystems, 92752 Nanterre, France). Series of 40 μ m-thick sections spanning the rostral third of the dorsal hippocampus were collected and rinsed in a 0.1 M veronal buffer (VB; pH 7.4). Sections anatomically matched with the sites of the electrophysiological recordings were processed free-floating for simultaneous triple-immunolabeling. Primary and secondary antisera were diluted in VB containing 0.25% Triton X-100 (Sigma) and applied at room temperature overnight and for 2 h, respectively. The primary antisera cocktail included 1 % normal goat serum, 1 % normal donkey serum, a polyclonal affinity-purified rabbit anti-mGluR5 (1:1000, Millipore no. AB5675), a mouse monoclonal anti-S100b (1:500, Sigma clone SH-B1 no. S2532) and a polyclonal affinity-purified chicken polyclonal anti-GFAP (1:3000, USBiologicals no. G2032-25F). The secondary antisera (all diluted 1:1000) cocktail included a goat-anti-rabbit-IgG-Atto 647N (Sigma no. 40839), a goat-anti-mouse-IgG-Atto 550 (Sigma no. 43394) and a donkey-anti-chicken-IgY-Alexa 488 (Jackson Labs no. 703-545-155). Finally, sections were rinsed in VB, mounted on slides, air-dried, counterstained with bisbenzimidazole (Sigma no. B-1155) and coverslipped (18mm x18mm high-performance cover glasses, Zeiss)

under an antifading medium made of 0.1 % para-phenylenediamine (Sigma no. P-6001) in 3 vol./1 vol. pure bidistilled glycerol and VB, respectively. In control experiments, omission of anyone of, or of all of, primaries in an otherwise normal procedure resulted in an absence of the respective color or in no labelling at all, respectively, indicating neither cross-reaction nor unspecific binding of the secondaries. The distribution of labelling for mGluR5, S100b, and GFAP was congruent with previous descriptions (Panatier et al., 2011).

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Four 11-week-old male Wistar Han rats (Janvier Labs, 53940 Le Genest-Saint-Isle, France) were overdosed i.p. with a mixture of Exagon (200 mg/kg) and lidocaine (20 mg/kg), and perfused transaortically (50 mL/min) with 100 mL of PBS with heparin followed by 500 mL of 4% paraformaldehyde in a 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4). The brains were dissected out and post-fixed overnight at 4 °C. Then, the brains were washed in TBS (pH = 7.6) and placed in TBS containing 30 % sucrose during 48 hours before being frozen in isopentane and stored at -80 °C. Serial 30 µm-thick sections were realized on a cryostat (Leica, CM 1950).

The following primers were used for the production of fluorescein-labeled riboprobe against rat *Grm5* mRNA (mGluR5-FITC): *Grm5* forward ACCCCTATCTGCTCTTCCTACC, *Grm5* Reverse GTCTACTGAATGGAGGGACCAG.

The first day, sections were washed 5 times under agitation in a PBS solution supplemented with 0.01 % diethylpyrocarbonate (PBS-DEPC). Then, they were incubated 30 min in PBS-DEPC with 1.5 % H₂O₂ and washed during 5 min in PBS-DEPC before a 20 min incubation in HCl-DEPC (0.2 M). After a 5 min wash in PBS-DEPC, sections were acetylated in a solution containing triethanolamine-HCl (0.1 M; pH = 8) and 0.25 % acetic anhydride for 10 min, and washed 5 min in PBS-DEPC. Sections were then pre-hybridized during 2 hours at 70 °C in a “Hybmix” solution composed of deionized formamide (50%), Tris-HCl (20 mM, pH = 8), NaCl (300 mM), EDTA (5 mM, pH = 8), dextran sulfate (10%); Denhardt’s solution(1X), tRNA (0.5 mg/ml), Ultrapure Salmon Sperm DNA (0.2 mg/ml) and DTT (200 mM). mGluR5-FITC

probe was diluted 1:500 in Hybmix and heated at 90 °C during 5 min before overnight hybridization at 70°C.

The second day, sections were washed at 65 °C in increased stringency buffers: 5 min in 5X saline sodium citrate (SSC) + 0.2 %Tween-20, then 30 min in 2X SSC + 0.2 %Tween-20 + 50 % Formamide, 30 min in 1X SSC + 0.2 %Tween-20 + 50 % Formamide and 30 min in 0.1X SSC + 0.2 %Tween-20 . Then, sections were washed in TNT buffer (0.1 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.1 % Tween-20) 2 times during 5 min at RT before being incubated during 1 h in “TNB” blocking buffer (Akoya Biosciences no. FP1012, prepared as per manufacturer’s instructions) supplemented with 4 % sheep serum and then 1 h in sheep anti-Fluorescein-POD antibody (1:500, Roche no. 11426346910, sheep) diluted in TNB. Sections were washed 3 times during 5 min in TNT before the revelation, using Cy3-Tryamide (1:200, Akoya Biosciences no. TS-000202) diluted in 1X Plus amplification diluent (Akoya Biosciences no. FP1498) for 10 min, after which they were washed 3 times during 10 min in PBS. Finally, sections were incubated overnight at RT with primary antibodies against S100 β (1:1000, Sigma no. S2644, rabbit) and GFAP (1:4000, USBiological no. G2032-25F, chicken) or against NeuN (1:3000, Millipore no. ABN91, chicken) all diluted in PBS-Triton 0.25 %-Donkey serum 1 %.

The third day, sections were washed 3 times during 10 min in PBS before being incubated during 2 h with donkey-anti-rabbit-AF488 (1:500, Jackson Immuno no.711-545-152) and donkey-anti-chicken-AF647 (1:500, Jackson immuno no. 703-605-155) or donkey-anti-chicken-AF488 (1:500, Jackson Immuno no.703-545-155) secondary antibodies diluted in PBS-Triton 0.25 %. Finally, sections were washed 3 times during 5 min in PBS and mounted Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, no H-1200).

Image acquisition

For STED imaging - Astrocytic profiles in the *stratum radiatum* of CA1 were observed and imaged under a Leica DMI6000 TCS SP8 X microscope operated either in confocal or STED modes. The four channels were acquired separately and their color selected for clarity purpose during between frame acquisitions (GFAP blue, mGluR5 green, S100b red, bisbenzimidazole

grey). Optical stacks acquired in STED mode were subjected to deconvolution (Huygens software, Scientific Volume Imaging, 1213 VB Hilversum, The Netherlands), they were merged and formatted using Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) and illustrations were arranged in Adobe Photoshop (Adobe Systems; San Jose, CA, USA) without further alteration of the images besides resizing/cropping.

For FISH experiments, pyramidal neurons, interneurons and astrocytes in the *stratum radiatum* of the CA1 area were observed and imaged under a Leica DM6000 TCS SP5 microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) using a HCX Plan Apo CS 63X 1.4 oil objective. The z-stacks of the four fluorescent channels were acquired sequentially to avoid fluorescence cross-talk. 3D analysis was performed using Imaris (Bitplane, Switzerland) to measure the density of *Grm5* mRNA. To do so 2 distinct masks were performed. For neuronal measurements, a mask has been obtained based on the NeuN channel in the CA1 pyramidal layer and the CA1 *stratum radiatum* with the Surfaces module. The density measurement of the *Grm5* mRNA has been done into this mask by using the module Spots. For sections immunolabeled with anti-GFAP and anti-S100 β , a mask of astrocytes has been obtained with the Surfaces module based on a composite channel created by merging the GFAP channel (staining astrocytic intermediate filaments) and on the S100 β channel (staining the whole astrocyte). The density measurement of the *Grm5* mRNA has been done into this mask by using the module Spots.

Chemicals

All drugs were bath-applied. Appropriate stock solutions were made and diluted with ACSF just before application. Drug used were CGS 21680 hydrochloride (30 nM; Tocris), LY 341495 (300 nM; Tocris), MPEP hydrochloride (25 μ M; Tocris), SCH 58261 (100 nM; Tocris), Picrotoxine (100 μ M; Tocris), tetrodotoxine Citrate (500 nM; Tocris).

Statistical analysis

The Mann-Whitney test was used for FISH experiments. The nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare the effect of a drug during miniature experiments. For evoked fEPSPs and EPSCs experiments, a two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons between groups was used. The statistical differences were established at $p < 0.05$. Graphpad Prism software was used for statistical analysis. Data were expressed as mean $\pm$ SEM.

Results

Astrocytes of adult rats express mGluR5

We first aimed at understanding whether astrocytes in the *stratum radiatum* of the CA1 area of adult rats express mGluR5. To this end, immunohistochemistry experiments were performed on fixed sections from 11- and 15-week-old rats (Figure 1). Astrocytes, in the *stratum radiatum* of the CA1 area were identified using a double immunostaining for GFAP and S100 β . Using this co-labelling, as reported before (Panatier et al., 2011), astrocytes were characterized by a small soma from which emerged GFAP/S100 β -positive principal processes and numerous S100 β -positive spongiform processes (Figure 1 A-D).

As expected, the labeling for mGluR5 was punctate and extensively expressed in the *stratum radiatum* of the CA1 area (Figure 1). Indeed, it has been reported that pyramidal neurons and interneurons express this receptor (Lujan et al., 1996). Confocal microscopy allowed revealing the presence of mGluR5 expression in astrocytes (Figure 1A-D). In addition, using super resolution STED microscopy, mGluR5 labelling overlapped with GFAP, in major processes and was also found in astrocytic compartments (Figure 1 E-G) as reported before (Panatier et al., 2011). Consistently, FISH experiments performed on fixed sections from 11-week-old rats revealed the presence of mRNA for mGluR5 at the level of astrocytic processes. As mGluR5 is also expressed at the level of post-synaptic neuronal elements, the density of the *Grm5* mRNA signal was calculated only inside GFAP positive processes, and not the thinner ones.

(Figure 1H, I, J). These data strongly suggest that astrocytes, in the *stratum radiatum* of the CA1 area of adult rats do express mGluR5.

mGluR5-A₂AR pathway up-regulates quantal release of glutamate in adulthood

Then, we decided to investigate whether quantal release of glutamate at individual synapses is up-regulated by activation of astrocyte mGluR5 in hippocampal slices from adult rats. To this end, patch-clamp experiments of pyramidal neurons in whole-cell configuration were performed and miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded (Figure 2). After a recording period of 15 minutes, MPEP (25 μ M) an antagonist of mGluR5 was applied in the perfusion bath (Figure 2). Application of MPEP induced an increase of the inter-event interval (2.02 ± 0.13 s, $n = 6$ vs. 2.98 ± 0.23 s, $n = 6$; $p = 0.03$, Wilcoxon test) and thus a decrease of mEPSCs frequency. Importantly, mEPSCs amplitude was not changed (-21.96 ± 1.11 pA vs. -21.86 ± 0.81 pA in MPEP; $p = 0.84$; Figure 2A-B), indicating that the efficacy of synaptic glutamatergic transmission is likely upregulated by a presynaptic mechanism, which depends on the activation of mGluR5. Because in juvenile rats the mGluR5-mediated facilitation involved the astroglial release of purines and the subsequent activation of A_{2A}Rs, we then tested the effect of an antagonist of these receptors (SCH 58261, 100 nM) on mEPSCs. As for MPEP, the application of SCH 58261 induced an increase of the inter-event interval (1.83 ± 0.37 s, $n = 7$ vs. 2.99 ± 0.50 s in SCH 58261, $n = 7$; $p = 0.01$), without modifying mEPSCs amplitude (-20.37 ± 0.96 pA vs. -19.27 ± 0.72 pA in SCH 58261; $p = 0.08$; Figure 2C-D). To confirm that both receptors were part of the same pathway an occlusion experiment was performed during which the impact of SCH 58261 was tested in the presence of MPEP, from the beginning of the experiment. This time, while MPEP was present in the perfusion bath, application of SCH 58261 did not modify neither mEPSCs inter-event interval (2.79 ± 0.46 s, $n = 7$ in MPEP vs. 2.95 ± 0.50 s in MPEP + SCH 58261, $n = 7$; $p = 0.47$) nor their amplitude (-20.64 ± 0.6 pA in MPEP vs. -20.7 ± 0.5 pA in MPEP + SCH 58261; $p > 0.99$; Figure 2E-F). Finally, to confirm that this pathway was dependent on astrocytes (Panatier et al., 2011), double patch-clamp experiments of a CA1 pyramidal neuron and an astrocyte in the *stratum*

radiatum, were performed (Figure 3). As during single patch-clamp experiment (Figure 2A-B), while an astrocyte was patched with a control internal solution, MPEP induced an increase of mEPSCs inter-event interval (3.92 ± 0.65 s vs. 7.37 ± 1.76 s in MPEP, $n = 6$; $p = 0.03$) without changing the amplitude (-19.29 ± 0.86 pA vs. -17.65 ± 0.74 pA; $p = 0.06$; Figure 3A-B). However, when an internal solution containing BAPTA (15 mM) was introduced in the patched-astrocyte, MPEP didn't affect significantly the mEPSCs inter-event interval (2.96 ± 0.26 s vs. 4.14 ± 0.62 s in MPEP; $p = 0.08$). mEPSCs amplitude was not affected neither (-17.95 ± 0.62 pA vs. -17.14 ± 0.73 pA in MPEP; $p = 0.37$; Figure 3 C-D).

mGluR5-A_{2A}R up-regulation only occurs when a small number of synapses are activated

Our data indicate that astrocytes up-regulate quantal release of glutamate at the level of individual synapses through the mGluR5-A_{2A} pathway. Interestingly, a single astrocyte has the capability to regulate around 100 000 neighboring synapses (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007). It is thus intriguing to ask whether an individual astrocyte regulates the efficacy of transmission as a function of the number of synapses activated inside its domain, and thus in respect to the activity occurring at neighboring synapses and network level. To this end, the afferent fiber volley and its associated field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the hippocampal CA1 *stratum radiatum*. The fiber volley amplitude reflects the number of stimulated presynaptic fibers, while fEPSP slope reflects the activity of synchronized neighboring synapses. The amplitude of stimulation was increased during the experiment, in order to recruit different number of synapses, from a small number (small fiber volley) to a higher one (bigger fiber volley). To isolate the presynaptic regulation, we measured the facilitation of glutamate release elicited by two synaptic stimulations at 100 ms interval. The associated paired pulse facilitation ratio (PPR) was measured and expressed as the ratio of the slope of the second fEPSP over the first one.

Interestingly, MPEP (25 μ M) induced a decrease of the first fEPSP slope when the amplitude of the fiber volley was < -0.02 mV (-0.02 ± 0.003 mV/ms vs. -0.011 ± 0.001 mV/ms in MPEP, $n = 20$; $p = 0.005$, two-way ANOVA followed by Sidak's test; Figure 4A-B) and < -0.04 mV (-0.06 ± 0.005 mV/ms vs. -0.05 ± 0.003 mV/ms in MPEP; $p = 0.001$). Accordingly, the associated PPR was significantly increased but only when fiber volley was < -0.02 mV (1.35 ± 0.12 vs. 2.98 ± 0.52 in MPEP; $p < 0.0001$, two-way ANOVA followed by Sidak's test; Figure 4C, Table1). Our data indicate that mGluR5 up-regulation only occurs when a small number of synapses are activated.

Finally, as for MPEP (Figure 4), the application of SCH 58261 (100 nM), the A_{2A} R antagonist, induced a decrease of the first fEPSP slope when the amplitude of the fiber volley was < -0.02 mV (-0.07 ± 0.02 mV/ms vs. 0.04 ± 0.01 mV/ms in SCH 58261, $n = 12$; $p = 0.001$, two-way ANOVA followed by Sidak's test; Figure 5 A-B) and < -0.04 mV (-0.11 ± 0.03 mV/ms vs. -0.09 ± 0.02 mV/ms in SCH 58261, $n = 9$; $p = 0.048$). Accordingly, the associated PPR was significantly increased but only when fiber volley was < -0.02 mV (1.49 ± 0.14 vs. 2.45 ± 0.29 ; $p < 0.0001$, two-way ANOVA followed by Sidak's test; Figure 5C, Table1).

These data indicate that mGluR5- A_{2A} R up-regulation only occurs when a small number of synapses are activated but not when a large number of synapses are recruited. This could reflect an integration process performed at the level of the astrocyte. Another possibility would be that presynaptic A_{2A} Rs couldn't be activated when a higher number of synapses were activated. To clarify this point, we used a specific agonist (CGS 21680, 30 nM) of A_{2A} Rs and analyzed its effect on fEPSPs evoked at different stimulus strengths. When the fiber volley was < -0.02 mV the A_{2A} R agonist didn't modify neither the slope of the first fEPSP (-0.21 ± 0.04 mV/ms vs. -0.25 ± 0.05 mV/ms in CGS 21680, $n = 6$; $p = 0.4437$) nor the PPR (1.56 ± 0.12 vs. 1.64 ± 0.08 in CGS 21680, $n = 6$; $p = 0.92$). Interestingly, it induced an increase of the first fEPSP slope when the fiber volley amplitude was ≥ -0.03 mV, suggesting that A_{2A} Rs are functional (Figure 5D). Surprisingly, the PPR was not significantly decreased (Figure 5E, Table 1).

mGluR5-A_{2A}R up-regulation is an astrocytic-dependent mechanism

In order to test whether this mechanism depends on astrocytes, fEPSPs were recorded through the patch pipette of a recorded astrocyte to be able to manipulate the intracellular content of an astrocyte and record at the same time fEPSPs evoked at the level of associated synapses (Henneberger and Rusakov, 2012; Sherwood et al., 2017). While MPEP still induced an increase of the PPR when the fiber volley was < -0.04 mV (1.74 ± 0.1 vs. 2.51 ± 0.32 in MPEP, $n = 9$; $p = 0.001$; Figure 6A-C) it was not the case when a Ca^{2+} -clamp solution was introduced in the recorded astrocyte (2.34 ± 0.22 vs. 2.07 ± 0.15 in MPEP, $n = 8$; $p = 0.49$; Figure 6D-F, Table 1).

An astrocytic-dependent mechanism that depends on an interaction of mGluR5 with Homer

It has been recently reported that the interaction of astrocytic mGluR5 with the scaffold protein Homer1b/c plays a key role in astrocytic mGluR5 function (Buscemi et al., 2017). Therefore, to investigate whether mGluR5-Homer1b/c interaction was necessary for this single synapse regulation we uncovered in hippocampal adult rats, we took advantage of two peptides that were developed (Mao et al., 2005) and used previously (Mao et al., 2005; O'Riordan et al., 2014; Ronesi et al., 2012; Ronesi and Huber, 2008; Tronson et al., 2010). The peptide mGluR5 C-tail decoy peptide (PPSPFR; mGluR5pep) was developed to disrupt mGluR5-Homer1b/c interaction as it is mimicking the carboxy-terminal tail of mGluR5 containing the Homer ligand domain (Mao et al., 2005). Importantly, the same group developed a control peptide with a dual point mutation in the binding motif rendering it incapable of binding Homer (PLSPRR) (Mao et al., 2005). Until now these peptides were fused to a Tat sequence allowing them to be membrane permeable and applied directly in the perfusion bath. As we wanted to assess the function of mGluR5-Homer1b/c interaction specifically in astrocytes, we took advantage of a viral approach. To this end, a Tag-RFP-T sequence was fused to the sequence of one of the two peptides. Then the genes of interest were inserted in an AAV2, serotype9 and were under

the control of the astrocyte-selective gfaABC1D promoter (Ceyzeriat et al., 2018; Lee et al., 2008). Therefore, two viruses were produced, the AAV9-tag-RFP-mGluR5pep to express the mGluR5 C-tail decoy peptide (mGluR5pep; Figures 7 and 8) and the AAV9-tag-RFP-Mutpep to express the control peptide.

Then to tackle the impact of mGluR5-Homer1/c interaction at the level of the single synapse, as before, we investigated the impact of MPEP on minimal synaptic stimulation, which allows to stimulate a putative single presynaptic fiber (Panatier et al., 2011). As expected, in sham animals, in which astrocytes were not fluorescent in the slices (Sham; Figure 7A), application of MPEP, 10 minutes after a stable baseline, induced an increase of the failure rate (from $32 \pm 13.5 \%$ to $74.33 \pm 20.74 \%$, $n=3$; $p = 0.01$; Figure 7A,D), whereas the potency (amplitude of evoked currents, without failures) of synaptic currents was unchanged (-17.23 ± 1.22 pA to -15.1 ± 2.81 pA; $p = 0.86$; Figure 7A,E), indicating again that mGluR5 activation upregulates the efficiency of basal synaptic transmission at individual CA3-CA1 synapses. As in the sham group, in acute slices coming from animals injected with the control AAV9-tag-RFP-Mutpep virus, the application of MPEP induced an increase of the failure rate (from $39.29 \pm 6.45 \%$ to $67.43 \pm 9.69 \%$ in MPEP, $n = 7$; $p = 0.01$; Figure 7B,D) with no modification of the potency (from -18.51 ± 3.14 pA to -14.12 ± 1.16 pA in MPEP, $n = 6$; $p = 0.23$; Figure 7B,E). Importantly, the expression of the mGluR5 C-tail decoy peptide (mGluRpep) specifically in astrocytes (AAV9-tag-RFP-mGluR5pep injected animals) occluded the effect of MPEP as the application of the drug had no impact on the failure rate (from $55.63 \pm 4.53 \%$ to $50.75 \pm 10.04 \%$ in MPEP, $n = 8$; $p = 0.91$; Figure 7C,D) nor the potency (from -15.76 ± 1.21 pA to -19.31 ± 1.60 pA, $n = 7$; $p = 0.39$; Figure 7C,E). Finally, when a higher, but still small number of presynaptic fibers contacting the recording neuron were stimulated, as for the fEPSPs recording (Figure 4), while the amplitude of the first evoked EPSCs was decreased by the application of MPEP in the Mutpep group (from -58.58 ± 14.7 pA to -42.78 ± 13.86 pA, $n = 5$; $p = 0.003$; Figure 8A, B), the PPR was not affected (from 1.8 ± 0.16 to 1.69 ± 0.19 in MPEP, $n = 5$; $p = 0.29$; Figure 8A, C). Importantly, the MPEP had no impact in the mGluR5pep group, neither on the amplitude

of the first EPSC (from -38.8 ± 5.68 to -44.5 ± 7.32 , $n = 8$; $p = 0.21$; Figure 8A, B) nor on the PPR (from 2.09 ± 0.1 to 2.035 ± 0.1 in MPEP, $n = 8$; $p = 0.78$; Figure 8A, C).

Discussion

In this study, we have shown that astrocytes of adult rats up-regulate quantal release of glutamate at the level of individual synapses through an mGluR5-A_{2A}R pathway. Importantly, this regulation only occurs when a small number of synapses are activated at the same time. Finally, this up-regulation of basal synaptic activity we uncovered depends on the interaction of astrocytic mGluR5 with the scaffold protein, Homer 1b/c.

In adulthood astrocytes express mGluR5

Accumulation of data in the literature indicate that astrocytes in adult rodents express functional mGluR5. Laviale and collaborators have reported that in adult rats, mGluR5 are expressed at the level of peripheral astrocyte processes (PAPs), thin processes in close apposition with synapses (Lavialle et al., 2011). While the expression of this receptor is decreasing in adulthood, it is not surprising that Sun and collaborators, using fluorescently activated cell sorting (FACS-array) reported that the level of mGluR5 was “undetectable” (Sun et al., 2013). Indeed, as for neurons, it has been shown that astrocytes are able to synthesize proteins at the level of processes (Sakers et al., 2017). Ribosomes and mRNA are present in PAPs (Sakers et al., 2017). Thus, it is mandatory to use a technique that will not alter astrocytic processes to study mRNA content. Furthermore, while the antagonist of group I mGluRs did not impair Ca²⁺ signals at the level of the soma, like in Sun and collaborators work (Sun et al., 2013), Tang and collaborators showed that MCPG induced a decrease of the amplitude of Ca²⁺ events in acute hippocampal slices from adult mice (Tang et al., 2015).

Our immunohistochemical and FISH data confirm that mGluR5 are expressed at the level of astrocytic processes. Using super resolution STED (stimulated-emission-depletion imaging) microscopy it was possible to visualize mGluR5 in colocalization with GFAP, thus in the major processes of astrocytes. In addition, mGluR5 labeling was present at the level of glial

compartments in thin processes that do not express GFAP, as reported in juvenile rats (Panatier et al., 2011).

Astrocytes up-regulate basal glutamatergic synaptic transmission only when a small number of synapses are activated

To investigate the role of astrocytes during basal synaptic transmission in juvenile rats, a specific protocol of stimulation was used to activate a single fiber (minimal synaptic stimulation protocol) (Panatier et al., 2011). In the present study, as in the work done by DiCastro and collaborators (Di Castro et al., 2011), we decided to first use another approach: the study of miniatures post-synaptic glutamatergic activity. Like in juvenile rats quantal release of glutamate at adult CA3-CA1 synapses was up-regulated by astrocytes through the mGluR5-A_{2A}R pathway. However, synapses are not isolated. Indeed, a single astrocyte in adult occupies an exclusive territory, called domain, allowing it to be in close apposition with an exclusive set of 100 000 neighboring synapses (Bushong et al., 2002). To study the activity of neighboring synapses belonging to several neurons we decided to perform extracellular electrophysiological recordings. Interestingly the mGluR5-A_{2A}R up-regulation only occurred when a small number of neighboring synapses was stimulated. This regulation allows to maintain a release probability equivalent to the one observed when a higher number of synapses was stimulated. Finally, we show that the astrocytic mGluR5 detection of EPSCs evoked from the single synapse level depends on the interaction of astrocytic mGluR5 and Homer1/c. Several questions emerge: 1). How and why the mGluR5-A_{2A}R pathway we uncovered is only present when a small number of neighboring synapses are activated? 2) What mechanism allows to maintain the same release probability when a higher number of synapses are activated? 3) What is the impact of the syncytium on this regulation?

Within a single astrocyte, one obvious candidate to mediate a putative intracellular cross-talk between gliosynaptic elements is Ca²⁺. Indeed, Ca²⁺ probably represents a sophisticated encoding process (Araque et al., 2014). Depending on its spatio-temporal profile, Ca²⁺ is likely

to encode distinct information. By using Ca^{2+} imaging it would be really interesting and important to investigate whether the number of synapses activated affects the nature of the astrocytic signal and consequently the regulation prevailing at individual synapses.

Acknowledgment

Grant sponsors: French National Research Agency (ANR-16-CE16-0001-01); Grant sponsor: Institut National de la Santé et de la Recherche and Centre National de la Recherche Scientifique (S.H.R.O. and A.P.). D.P. is supported by a studentship from the “Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche”. V.S. is supported by the FRM PhD fellowship FDT201805005371 and ANR-18-CE14-0029(to D.C.). The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France Biolmaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).The help of Christel Poujol, Magali Mondin and Patrice Mascalchi is acknowledged.

References

- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81, 728-739.
- Arizono M, Inavalli V, Panatier A, Pfeiffer T, Angibaud J, Levet F, Ter Veer MJT, Stobart J, Bellocchio L, Mikoshiba K, *et al.* (2020). Structural basis of astrocytic Ca(2+) signals at tripartite synapses. *Nat Commun* 11, 1906.
- Bindocci E, Savtchouk I, Liaudet N, Becker D, Carriero G and Volterra A. (2017). Three-dimensional Ca(2+) imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science* 356.
- Buscemi L, Ginet V, Lopatar J, Montana V, Pucci L, Spagnuolo P, Zehnder T, Grubisic V, Truttman A, Sala C, *et al.* (2017). Homer1 Scaffold Proteins Govern Ca²⁺ Dynamics in Normal and Reactive Astrocytes. *Cereb Cortex* 27, 2365-2384.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ and Ellisman MH. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience* 22, 183-192.
- Cai Z, Schools GP and Kimelberg, H.K. (2000). Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. *Glia* 29, 70-80.
- Ceyzeriat K, Ben Haim L, Denizot A, Pommier D, Matos M, Guillemaud O, Palomares MA, Abjean L, Petit F, Gipchtein P, *et al.* (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 6, 104.
- D'Ascenzo M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Auberson YP, Moss SJ and Haydon PG. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1995-2000.
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, Tiret P and Volterra A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience* 14, 1276-1284.

- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG and Carmignoto G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729-743.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong J-H and Haydon PG. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of neuroscience* 27, 6473-6477.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR and Rusakov DA. (2010). Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232-236.
- Henneberger C and Rusakov DA. (2012). Monitoring local synaptic activity with astrocytic patch pipettes. *Nature Protocols* 7, 2171-2179.
- Honsek SD, Walz C, Kafitz KW and Rose CR. (2010). Astrocyte calcium signals at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses correlate with the number of activated synapses but not with synaptic strength. *Hippocampus* 22, 29-42.
- Latour I, Gee CE, Robitaille R and Lacaille JC. (2001). Differential mechanisms of Ca²⁺ responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* 11, 132-145.
- Lavialle M, Aumann G, Anlauf E, Prols F, Arpin M and Derouiche A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1-5.
- Lee Y, Messing A, Su M and Brenner M. (2008). GFAPpromoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56, 481-493.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R and Somogyi P. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 8, 1488-1500.
- Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G, and Wang J.Q. (2005). The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *The Journal of neuroscience* 25, 2741-2752.

- O'Riordan K, Gerstein H, Hullinger R and Burger C. (2014). The role of Homer1c in metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Hippocampus* 24, 1-6.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet J-P, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA and Oliet SHR. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125, 775-784.
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille J-C and Robitaille R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of Basal transmission at central synapses. *Cell* 146, 785-798.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul J-Y, Takano H, Moss SJ, McCarthy K and Haydon PG. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310, 113-116.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T and Carmignoto G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *The Journal of neuroscience* 17, 7817-7830.
- Porter JT and McCarthy KD. (1995). GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia* 13, 101-112.
- Porter JT and McCarthy KD. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *The Journal of neuroscience* 16, 5073-5081.
- Ronesi JA, Collins KA, Hays SA, Tsai N-P, Guo W, Birnbaum SG, Hu J-H, Worley PF, Gibson JR and Huber KM. (2012). Disrupted Homer scaffolds mediate abnormal mGluR5 function in a mouse model of fragile X syndrome. *Nature Publishing Group* 15, 431-440.
- Ronesi JA and Huber KM. (2008). Homer Interactions Are Necessary for Metabotropic Glutamate Receptor-Induced Long-Term Depression and Translational Activation. *The Journal of neuroscience* 28, 543-547.
- Sakers K, Lake AM, Khazanchi R, Ouwenga R, Vasek MJ, Dani A and Dougherty JD. (2017). Astrocytes locally translate transcripts in their peripheral processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E3830-E3838.

- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille J-C and Robitaille R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *The Journal of neuroscience* 26, 5370-5382.
- Sherwood MW, Arizono M, Hisatsune C, Bannai H, Ebisui E, Sherwood JL, Panatier A, Oliet, SHR and Mikoshiba K. (2017). Astrocytic IP 3Rs: Contribution to Ca²⁺ signalling and hippocampal LTP. *Glia* 101, 9441-9446.
- Stobart JL, Ferrari KD, Barrett MJP, Gluck C, Stobart MJ, ZuendM and Weber B. (2018). Cortical Circuit Activity Evokes Rapid Astrocyte Calcium Signals on a Similar Timescale to Neurons. *Neuron* 98, 726-735 e724.
- Sun M-Y, Devaraju P, Xie AX, Holman I, Samones E, Murphy TR and Fiacco TA. (2014). Astrocyte calcium microdomains are inhibited by Bafilomycin A1 and cannot be replicated by low-level Schaffer collateral stimulation in situ. *Cell calcium* 55, 1-16.
- Sun W, McConnell E, Pare JF, Xu Q, Chen M, Peng W, Lovatt D, Han X, Smith Y, and Nedergaard M. (2013). Glutamate-Dependent Neuroglial Calcium Signaling Differs Between Young and Adult Brain. *Science* 339, 197-200.
- Tang W, Szokol K, Jensen V, Enger R, Trivedi CA, Hvalby O, Helm PJ, Looger LL, Sprengel R and Nagelhus EA. (2015). Stimulation-Evoked Ca²⁺ Signals in Astrocytic Processes at Hippocampal CA3-CA1 Synapses of Adult Mice Are Modulated by Glutamate and ATP. *The Journal of neuroscience* 35, 3016-3021.
- Tronson NC, Guzman YF, Guedea AL, Huh KH, Gao C, Schwarz MK and Radulovic J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptor 5/Homer Interactions Underlie Stress Effects on Fear. *Biological Psychiatry* 68, 1007-1015.
- Wang X, Lou N, Xu Q, Tian G-F, Peng WG, Han X, KangJ, Takano Tand Nedergaard M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature Neuroscience* 9, 816-823.

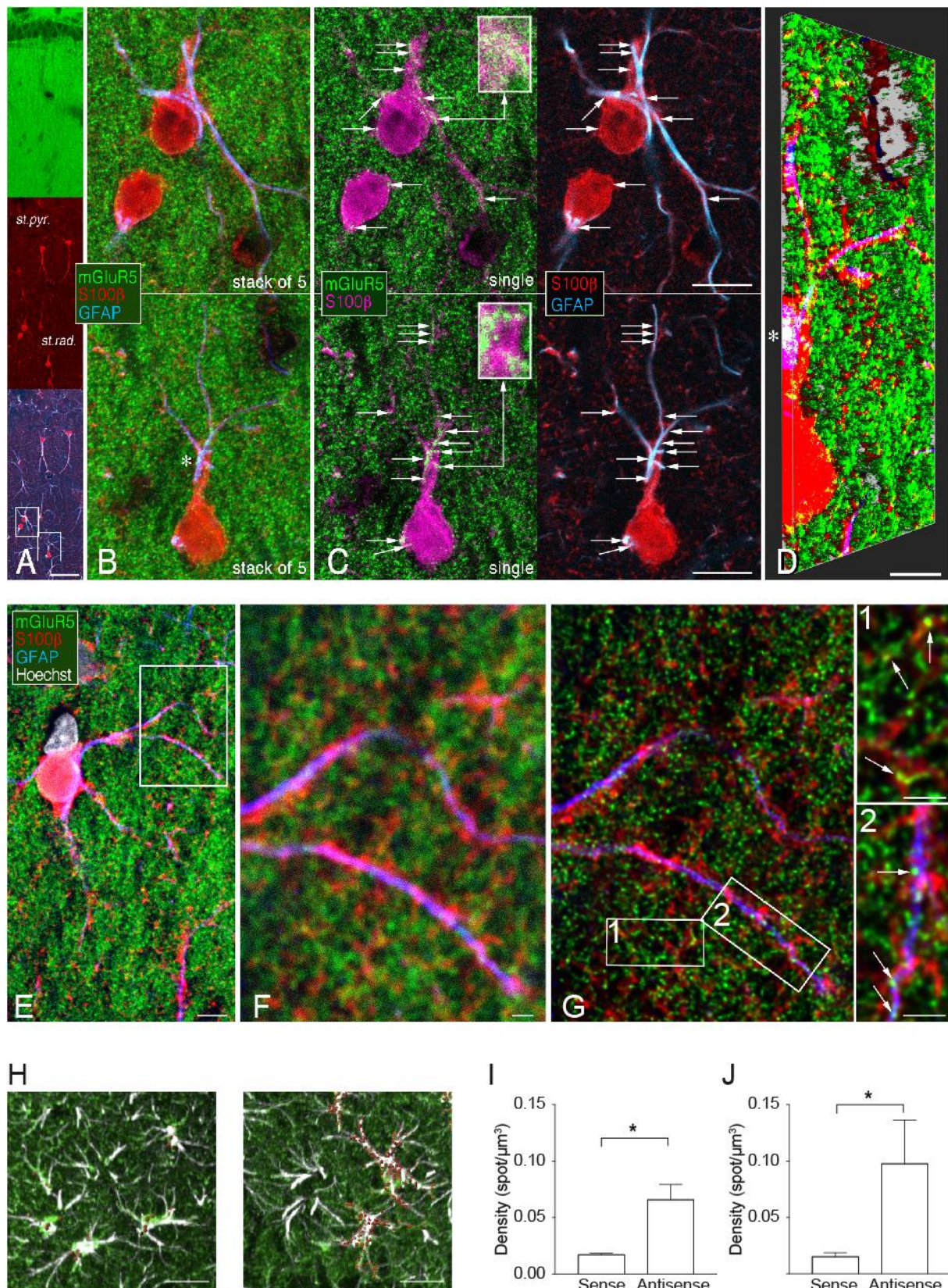


FIGURE 1: Localization of mGluR₅ in adult hippocampal astrocytes using confocal and STED microscopy. (A-D) Triple-labeled histological sections, in the CA1 *stratum radiatum* (st.rad), viewed in confocal microscopy through channels for GFAP (blue), mGluR5 (green) or S100β (red/magenta; 11-week-old rat). (A) Low magnification view (maximum intensity

projection, MIP, $z = 0.95 \mu\text{m}$) indicating the localization of astrocytes that were imaged with a higher magnification in **B** and **C**. (**B-C**) Merged channels of MIPs ($z = 0.95 \mu\text{m}$) and (**C**) single planes ($z = 0.19 \mu\text{m}$) show how mGluR5-positive patches decorate astrocytes. To confirm their localization in astrocytes, arrows and enlarged insets indicate the co-localization of mGluR5 with GFAP signals. (**D**) Surface rendering dissecting the cell marked by an asterisk in (**B**). (**E-G**) Quadruple-labelled histological section, through the CA1 *stratum radiatum*, (15 week-old rat) viewed in confocal (**E, F**) and STED (**G**) microscopy through channels for GFAP (blue), mGluR₅ (green), S100 β (red) or Hoechst (grey). (**E**) Low magnification view (single optic slice; $z = 0.98 \mu\text{m}$) of the astrocyte that was imaged with a higher magnification in (**F**) and (**G**). (**G**) In inset 1, arrows point to mGluR₅ signal located in astrocytic compartments (overlap between mGluR₅ patches and cytoplasmic S100 β). In inset 2, arrows point to overlap between mGluR₅ and GFAP signals. (**H, I, J**) FISH experiments. (**H**) Example of a 3D reconstruction from confocal sections reconstructed with Imaris through channels for S100 β (Green), *Grm5* mRNA (Red) and GFAP (White). (**I**) Bar graph representing the density of red spots labeling either the sense probe or the antisense probe for *Grm5* mRNA in the cell body of pyramidal neurons or interneurons in the CA1 *stratum radiatum* labeled with NeuN antibody. (**J**) Bar graph representing the density of red spots labeling either the sense probe or the antisense probe for *Grm5* mRNA in astrocytes in the CA1 *stratum radiatum* labeled with S100 β and GFAP. Data are represented as mean $\pm$ SEM. Mann-Whitney test. Scale bars in (**A**), 50 μm ; in (**B**) and (**C**), 10 μm ; in (**D**), 5 μm ; in (**E**), 5 μm ; in (**F**) and (**G**), 1 μm ; (**H**), 10 μm .

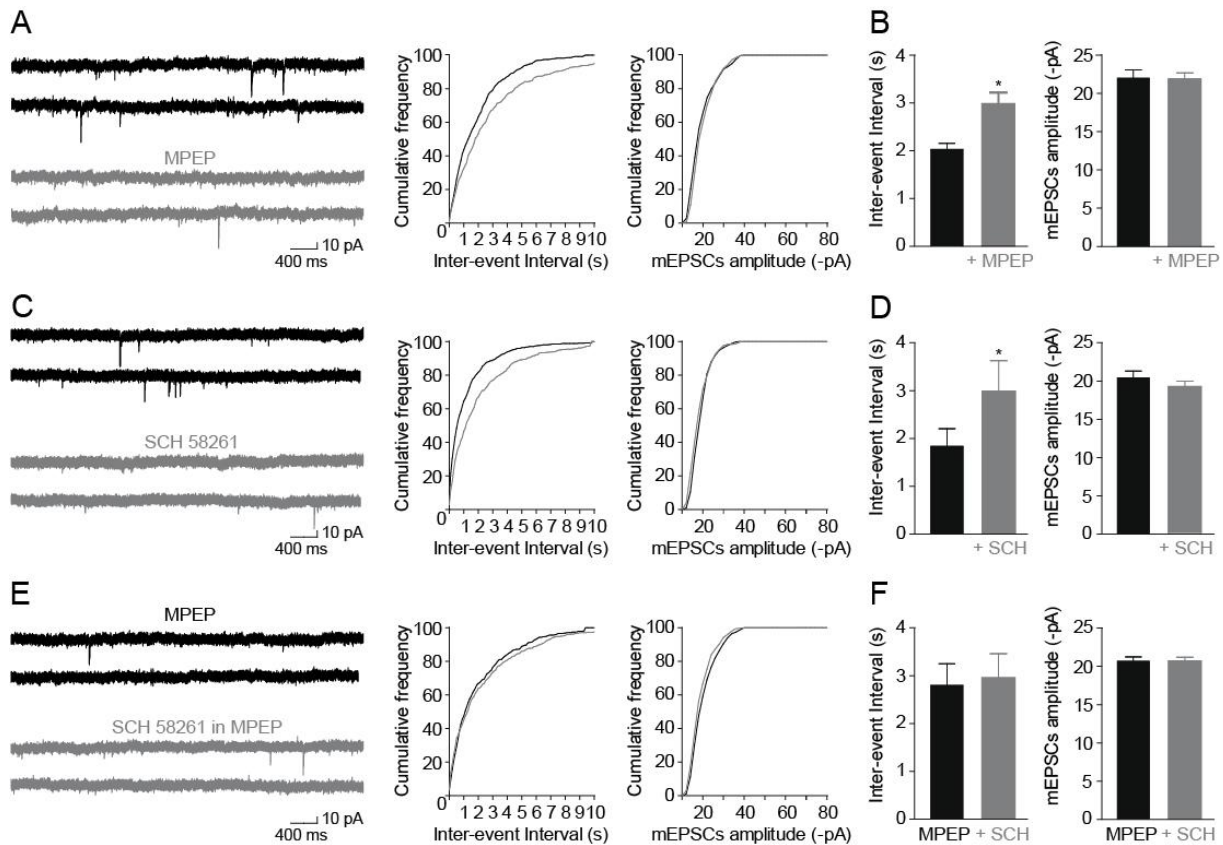


FIGURE 2: mGluR₅ up-regulate miniature activity through a presynaptic A_{2A} receptor-dependent mechanism. (A, C, E; left) Traces showing typical mEPSC activity recorded before (black) and after (grey) the application of MPEP (25 μ M), SCH 58261 (100 nM) and SCH 58261 in the presence of MPEP. (A, C, E; right) Cumulative plots of inter-event intervals and amplitude distributions before and after MPEP application, SCH 58261 or SCH58261 in the presence of MPEP, for the cell illustrated on the left. (B, D) MPEP and SCH 58261 induced a reduction of mEPSCs frequency, while their amplitude didn't change. (F) Importantly the effect of SCH 58261 was occluded by the application of MPEP. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Wilcoxon test, * $p < 0.05$.

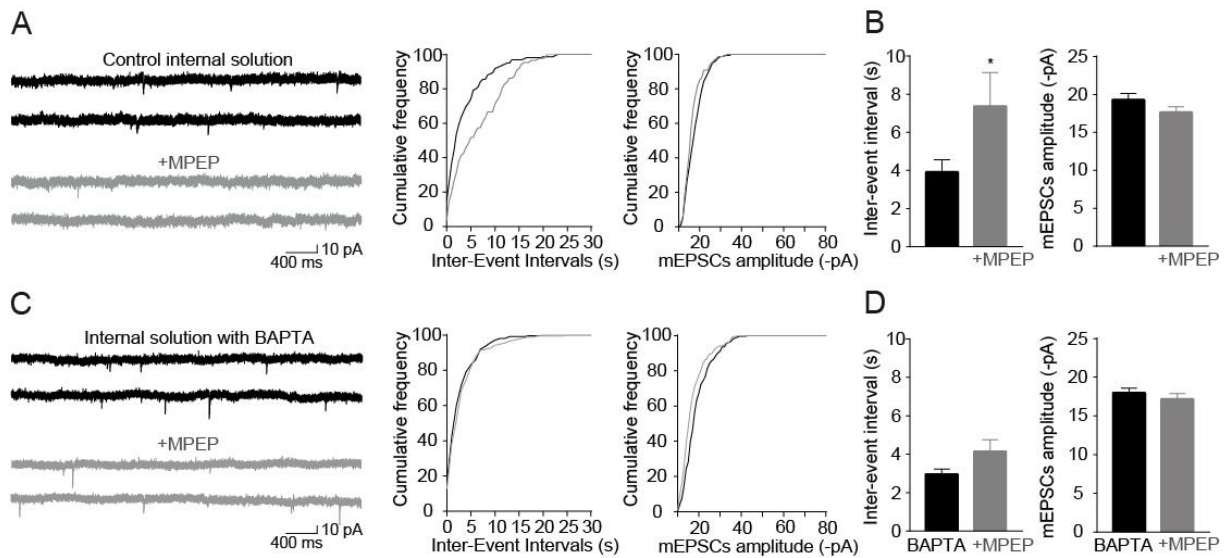


FIGURE 3: Blocking astrocytic Ca^{2+} prevents mGluR5-dependent up-regulation of miniature activity. (A, C; left) Traces showing typical mEPSC activity recorded before and after the application of MPEP (25 μM) in condition of (A) control internal solution or (C) BAPTA (15 mM)-containing internal solution. (A, C; right) Cumulative plots of inter-event intervals and amplitude distributions before and after MPEP application in condition of (A) control internal solution or (C) BAPTA (15 mM)-containing internal solution, for the cell illustrated on the left. (B) MPEP induced a reduction of mEPSCs frequency, while their amplitude did not change when a control internal solution was used. (D) Importantly there was no more effect of MPEP when astrocytic Ca^{2+} was blocked by BAPTA. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Wilcoxon test, $*p < 0.05$.

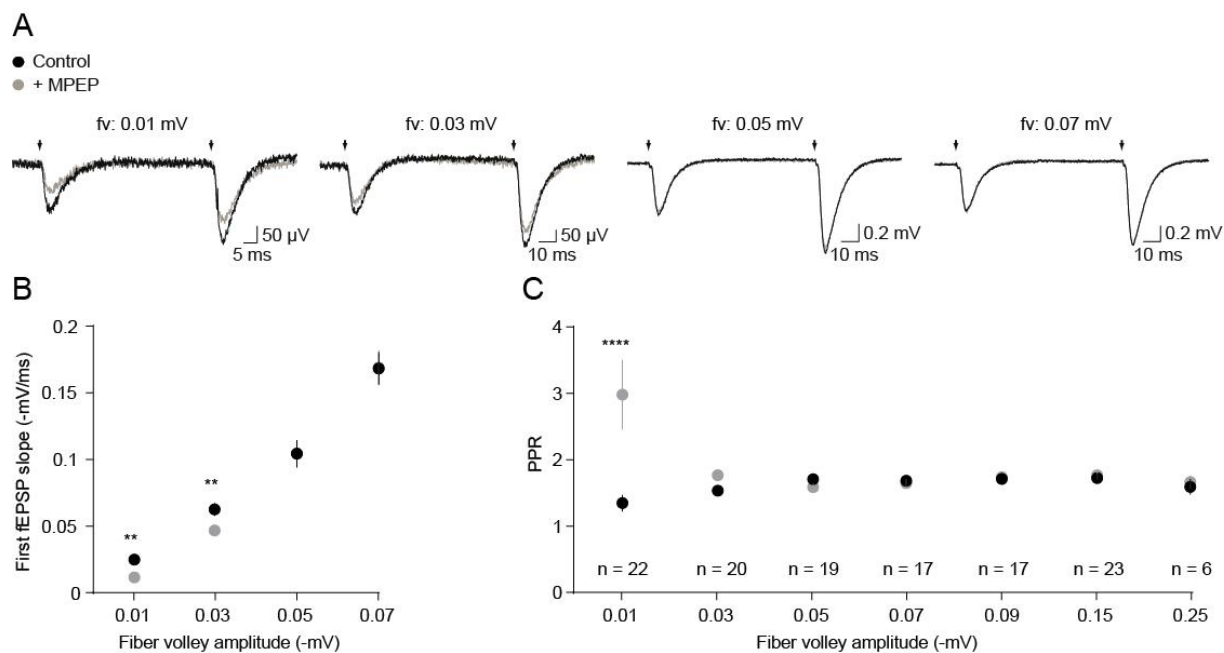


FIGURE 4: mGluR₅ up-regulation only occurs when the number of synapses activated is small. (A, D) Representative traces of fEPSPs before and after the application of MPEP (25 μ M), an antagonist of mGluR₅ and LY 341495 (0.3 μ M), an antagonist of mGluR₃ receptors. (B, C) When a small number of synapses was stimulated (fiber volley amplitude < 0.02 mV) MPEP induced (B) a decrease of the first slope of fEPSPs, and thus (C) an increase of the paired pulse ratio (or PPR). fv, fiber volley. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Two-way repeated measures ANOVA, * p < 0.05.

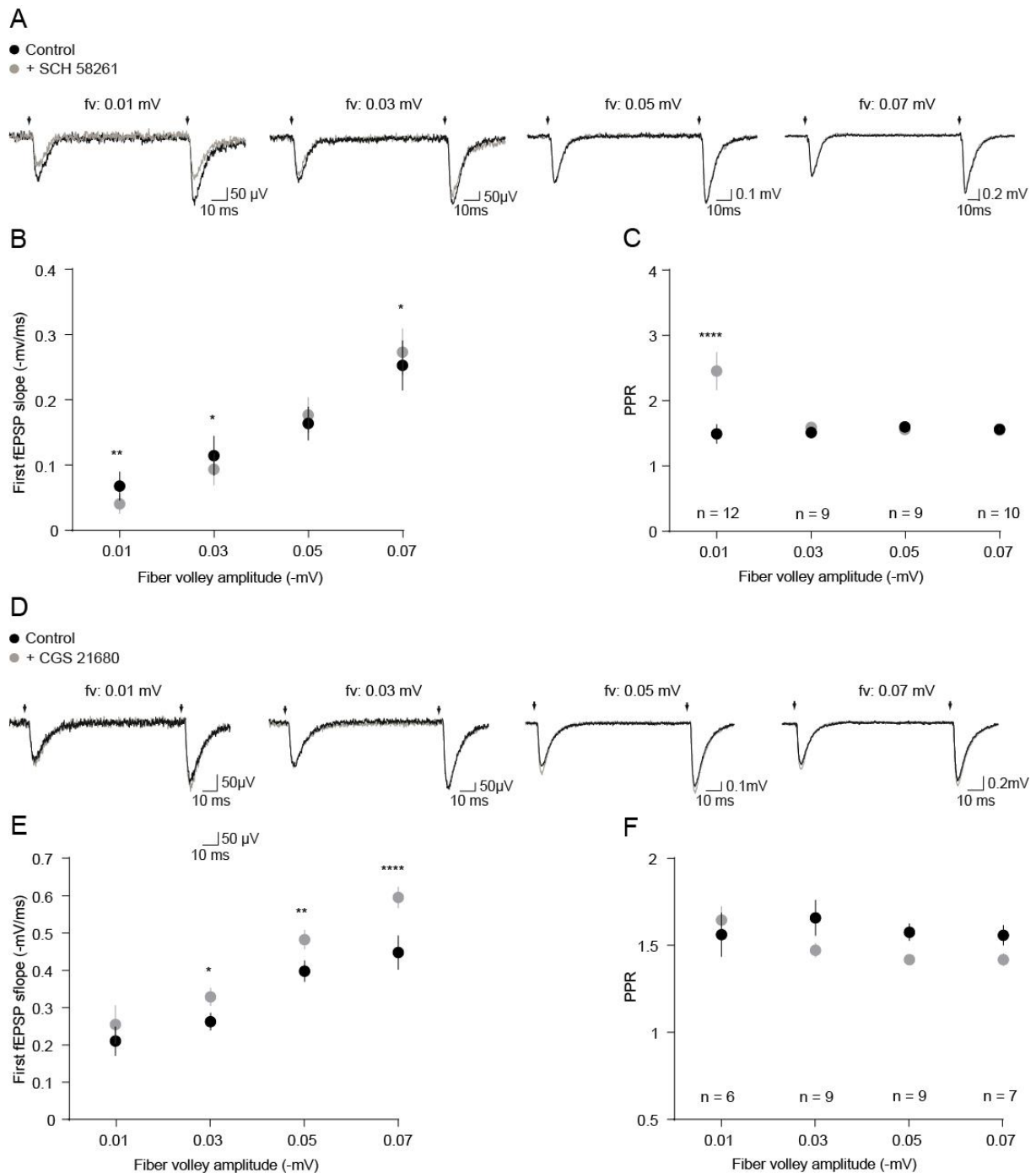


Figure 5. A_{2A} receptor-dependent up-regulation only occurs when the number of synapses activated is small. (A, D) Representative traces of fEPSPs before and after the application of SCH 58261 (100 nM), an antagonist of A_{2A} receptors and CGS 21 680 (30 nM), an agonist of A_{2A} receptors. (B, C) When a small number of synapses was stimulated (fv < 0.02 mV) SCH 58261 induced (B) a decrease of the first slope of fEPSPs, and thus (C) an increase of the PPR. (E, F) CGS 21 680 had no impact on the (E) first fEPSPs slope or (F) PPR when the amplitude of the fiber volley was = 0.01 mV, indicating that the pathway was endogenously activated. Importantly, presynaptic A_{2A} receptors were still functional when a higher number of synapses was stimulated, as CGS 21680 induced (E) an increase of the first fEPSPs slope associated with (F) a decrease of the PPR when the amplitude of the fiber volley was $\geq$ 0.05 mV. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Two-way repeated measures ANOVA, * p < 0.05.

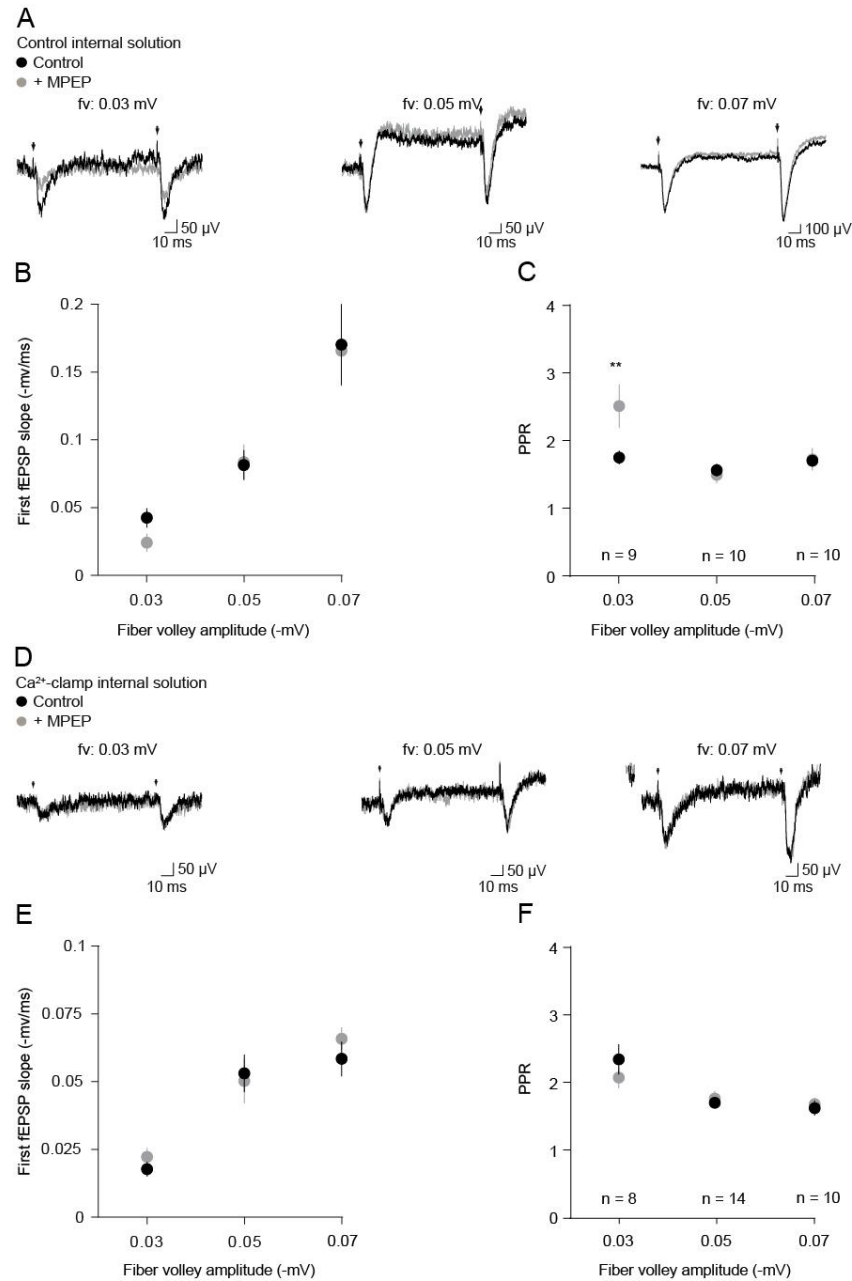


FIGURE 6: Blocking astrocytic Ca²⁺ prevents mGluR5-dependent up-regulation only when the number of synapses activated in the domain is small. (A, D) Representative traces of fEPSPs before and after the application of MPEP (25 μ M) in condition of (A) control internal solution or (D) Ca²⁺-clamp solution. (B, C) MPEP induced (B) a decrease of the first slope of fEPSPs, and thus (C) an increase of the PPR when a small number of synapses was stimulated (fv = 0.03 mV). (E, F) Importantly there was no additional effect of MPEP when astrocytic Ca²⁺ was blocked. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Two-way repeated measures ANOVA, *p < 0.05.

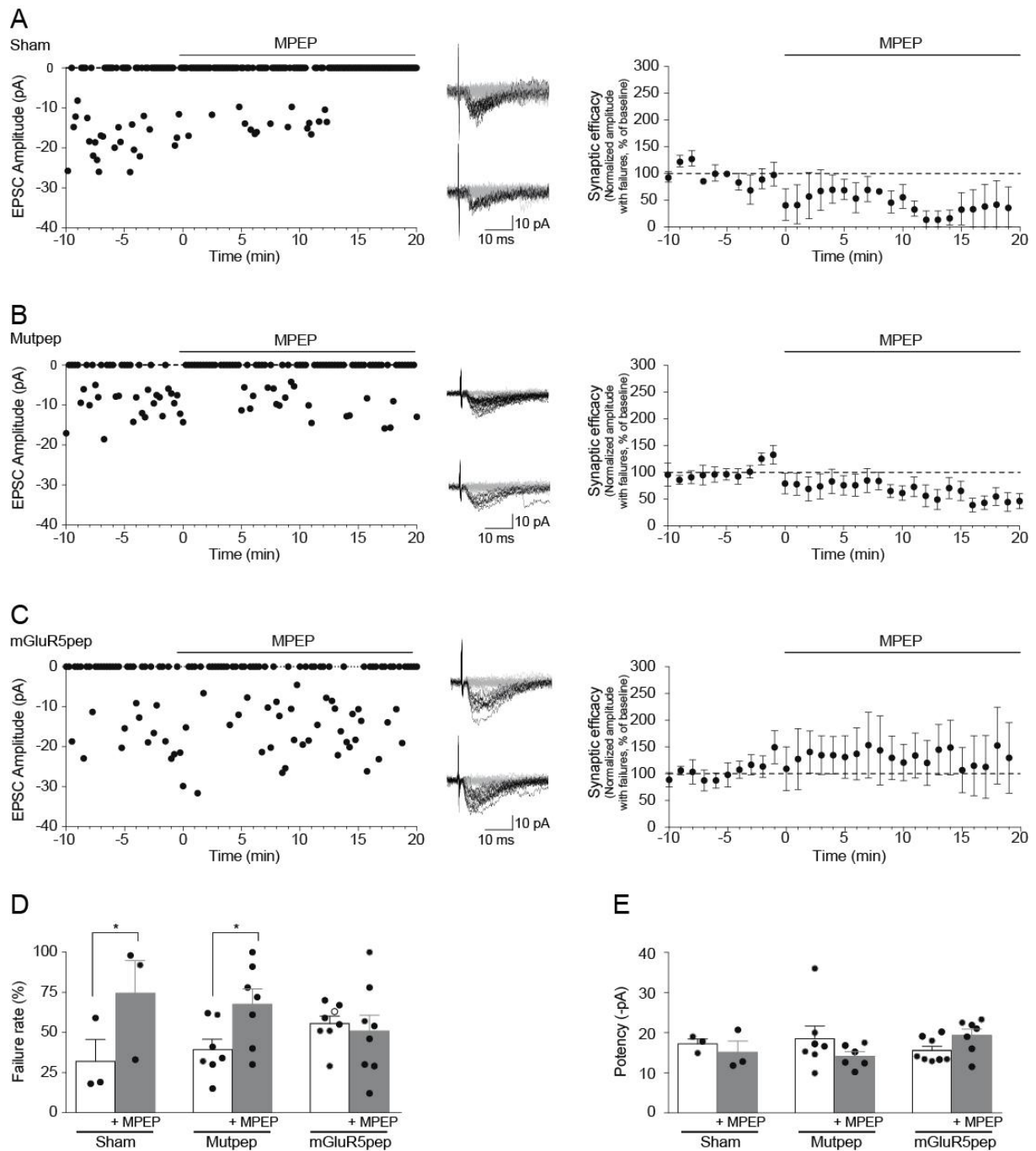


FIGURE7: The single synapse regulation depends on the interaction between astrocytic mGluR5 and Homer1/c. (A, B, C) On the left, are represented the plot of the amplitude of EPSCs evoked by a minimal synaptic stimulation from a representative cell (left) in the 2 control groups sham (A) and Mutpep (control peptide, B) as well as in the mGluR5pep group (mGluR5 C-tail decoy peptide, C). Traces, in the middle, represent 40 superimposed successive events (evoked EPSCs and failures) 10 minutes before the application of MPEP (top) and in between 10 and 20 minutes in MPEP (bottom). On the right are represented the time course for all cells in the two control groups sham (A) and Mutpep (control peptide, B) as well as in the mGluR5pep group (mGluR5 C-tail decoy peptide, C). (D) Bar graph summarizing the effect of MPEP on the failure rate in the 3 groups. Data are represented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA with a multiple comparison test. (E) Bar graph summarizing the effect of MPEP on the potency in the 3 groups. Data are represented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA with a multiple comparison test.

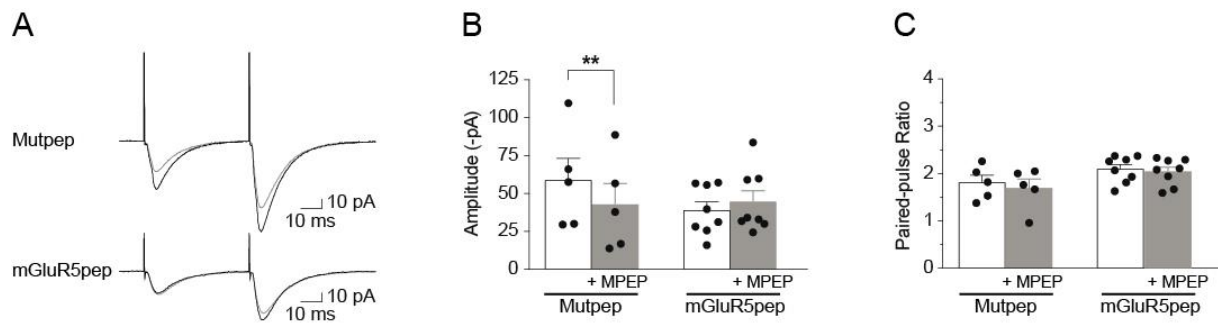


FIGURE8: mGluR5 upregulates the efficacy of synaptic activity when a small number presynaptic fibers contacting a neuron are activated. (A) Traces represent 40 superimposed successive events evoked 10 minutes before the application of MPEP and in between 10 and 20 minutes in MPEP in the control group Mutpep (top) and the mGluR5pep group (mGluR5 C-tail decoy peptide, bottom). (B) Bar graph summarizing the effect of MPEP on the amplitude of evoked EPSCs in the 2 groups. Data are represented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA with a multiple comparison test. (C) Bar graph summarizing the effect of MPEP on the paired pulse ratio (PPR) of evoked EPSCs in the 2 groups. Data are represented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA with a multiple comparison test.

First fEPSP slope								
	0.01		0.03		0.05		0.07	
Figure 4		MPEP		MPEP		MPEP		MPEP
Mean (mV/ms)	-0.02	-0.01	-0.06	-0.05	-0.10	-0.10	-0.17	-0.17
SEM	0.003	0.001	0.005	0.003	0.010	0.010	0.012	0.013
n	22		20		19		17	
p	0.005		0.001		>0,9999		0,9998	
		LY 341495		LY 341495		LY 341495		LY 341495
Mean (mV/ms)	-0.19	-0.21	-0.23	-0.25	-0.32	-0.34	-0.43	-0.47
SEM	0.03	0.03	0.05	0.06	0.05	0.05	0.03	0.03
n	7		6		9		5	
p	0.90		0.85		0.74		0.14	
Figure 5		SCH58261		SCH58261		SCH58261		SCH58261
Mean (mV/ms)	-0.07	-0.04	-0.11	-0.09	-0.16	-0.18	-0.25	-0.27
SEM	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03
n	12		9		9		10	
p	0.001		0.048		0.35		0.038	
		CGS21680		CGS21680		CGS21680		CGS21680
Mean (mV/ms)	-0.21	-0.25	-0.26	-0.33	-0.398	-0.48	-0.45	-0.59
SEM	0.04	0.05	0.02	0.02	0.023	0.02	0.04	0.03
n	6		9		9		7	
p	0.44		0.03		0.005		<0,0001	
Cont.internal Figure 6				MPEP		MPEP		MPEP
Mean (mV/ms)			-0.04	-0.026	-0.08	-0.08	-0.17	-0.16
SEM			0.007	0.006	0.01	0.01	0.03	0.02
n			9		10		10	
p			0.14		0.99		0.91	
Ca2+ Clamp				MPEP		MPEP		MPEP
Mean (mV/ms)			-0.02	0.02	-0.05	-0.05	-0.06	-0.07
SEM			0.002	0.003	0.006	0.008	0.006	0.004
n			8		14		10	
p			0.71		0.81		0.23	

PPR								
	0.01		0.03		0.05		0.07	
Figure 4		MPEP		MPEP		MPEP		MPEP
Mean	1.35	2.98	1.54	1.77	1.71	1.59	1.68	1.65
SEM	0.12	0.52	0.07	0.07	0.07	0.06	0.08	0.06
n	22		20		19		17	
p	<0,0001		0,92		0,99		>0,9999	
		LY 341495		LY 341495		LY 341495		LY 341495
Mean	1.46	1.47	1.37	1.41	1.48	1.44	1.46	1.51
SEM	0.12	0.11	0.06	0.08	0.07	0.04	0,04	0.08
n	7		6		9		5	
p	0.99		0.99		0.99		0.99	
Figure 5		SCH58261		SCH58261		SCH58261		SCH58261
Mean	1.49	2.45	1.51	1.59	1.59	1.56	1.56	1.55
SEM	0.14	0.29	0.07	0.06	0.04	0.05	0.03	0.03
n	12		9		9		10	
p	<0,0001		0.99		0.99		>0,9999	
		CGS21680		CGS21680		CGS21680		CGS21680
Mean	1.56	1.64	1.66	1.47	1.58	1.42	1.56	1.42
SEM	0.12	0.08	0.10	0.04	0.05	0.03	0.06	0.03
n	6		9		9		7	
p	0.92		0.19		0.34		0.56	
Cont.internal Figure 6				MPEP		MPEP		MPEP
Mean			1.74	2.51	1.56	1.49	1.70	1.73
SEM			0.10	0.32	0.09	0.13	0.09	0.16
n			9		10		10	
p			0,001		0,97		0,99	
Ca2+ Clamp				MPEP		MPEP		MPEP
Mean			2.34	2.07	1.69	1.76	1.62	1.68
SEM			0.22	0.15	0.07	0.11	0.11	0.09
n			8		14		10	
p			0,49		0,97		0,98	

TABLE 1: Statistical data for Figure 4, 5 and 6.

Figures complémentaires

Afin de m'assurer que l'expression du virus mGluR5 dominant négatif (mGluR5pep) ne bloquait pas la transmission de manière aspécifique, j'ai réalisé des enregistrements de potentiels de champs à une amplitude de stimulation pour laquelle l'antagoniste mGluR5 (MPEP) n'a pas d'effet (Figure 4 de l'article). On note que dans ces conditions expérimentales, la réponse synaptique moyenne n'est pas différente de celle des individus ayant reçu le peptide contrôle.

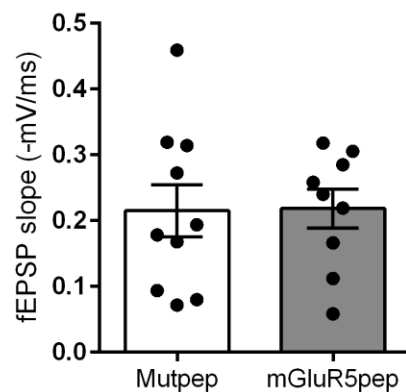


Figure 1 : Le blocage du mGluR5 par le peptide dominant négatif n'induit pas un blocage aspécifique de la transmission synaptique. Pentas des potentiels de champs postsynaptiques (fEPSP) en réponse à une stimulation induisant 40% de la réponse maximale. Il s'agit d'une gamme de stimulations pour laquelle le MPEP n'a pas d'effet (voir Figure 4 de l'article). On remarque que la transmission synaptique glutamatergique n'est pas différente entre les animaux ayant reçu le peptide dominant négatif (mGluR5pep) de ceux ayant reçu le peptide contrôle (Mutpep). Cela suggère que l'expression du peptide n'a pas altéré le fonctionnement de la synapse et cela apporte une confirmation que la régulation liée au mGluR5 astrocytaire n'est plus visible lorsque l'activité synaptique augmente. Les histogrammes représentent la moyenne $\pm$ déviation standard. Test statistique : test de Student.

Lors d'une stimulation modérée induisant l'activation de plusieurs synapses, un effet du peptide mGluR5 est toujours visible (Figure 8 de l'article). Contrairement à ce qui était attendu, le PPR n'a pas été impacté par le blocage du mGluR5. Cette expérience n'ayant pas confirmé la localisation présynaptique de la modulation, je me suis demandé si les purines astrocytaires pouvaient aussi agir au niveau postsynaptique. J'ai donc décidé de tester par un blocage pharmacologique si elles agissaient sur les P2X postsynaptiques. L'antagoniste des P2X diminue l'amplitude des courants postsynaptiques du groupe contrôle et du groupe ayant reçu le peptide dominant négatif. Cela indique que les récepteurs P2X jouent un rôle dans la transmission synaptique de base mais que leur activation n'est pas dépendante du mGluR5 astrocytaire. Par ailleurs, ce résultat suggère que les changements de régulation de la transmission induits par l'expression du peptide sont spécifiques des voies impliquant le mGluR5 astrocytaire.

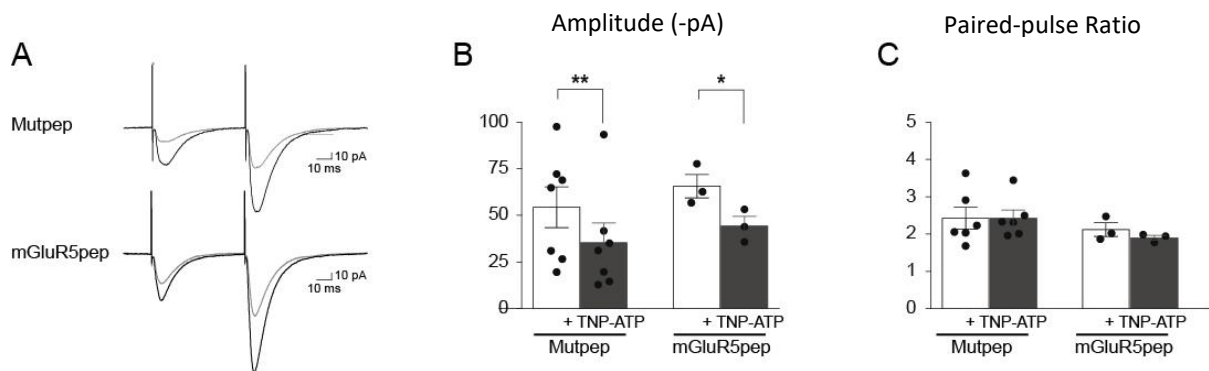


Figure 2 : Les récepteurs P2X jouent un rôle dans la transmission synaptique de base mais leur activation n'implique pas le mGluR5 astrocytaire. **A.** Courants postsynaptiques excitateurs (EPSC) évoqués par une paire de stimulations (moyenne de 40 réponses consécutives) avant (gris) et 15 minutes après (noir) l'application d'un antagoniste des P2X (TNP-ATP ; 30 μ M). Traces représentatives pour les groupes contrôle (Mutpep) et mGluR5pep. **B.** Histogramme résumant l'effet du TNP-ATP sur l'amplitude des EPSC pour les groupes contrôle (Mutpep) et mGluR5pep. **C.** Histogramme résumant l'effet du TNP-ATP sur le ratio (PPR) pour les groupes contrôle (Mutpep) et mGluR5pep. Les histogrammes représentent la moyenne $\pm$ déviation standard. Test statistique : ANOVA à 2 facteurs avec test post-hoc de Sidak

L'astrocyte joue un rôle clé dans l'induction de la LTP en contrôlant la disponibilité du co-agoniste du RNMDA. J'ai donc réalisé des expériences de LTP pour tester si le mGluR5 astrocytaire jouait un rôle dans son induction. J'ai mis en évidence que le peptide mGluR5 dominant négatif provoque un déficit de LTP qui est compensé par un apport exogène en D-sérine. Ce résultat suggère que la détection de la transmission par le mGluR5 astrocytaire pourrait jouer un rôle dans la disponibilité en D-sérine à la synapse.

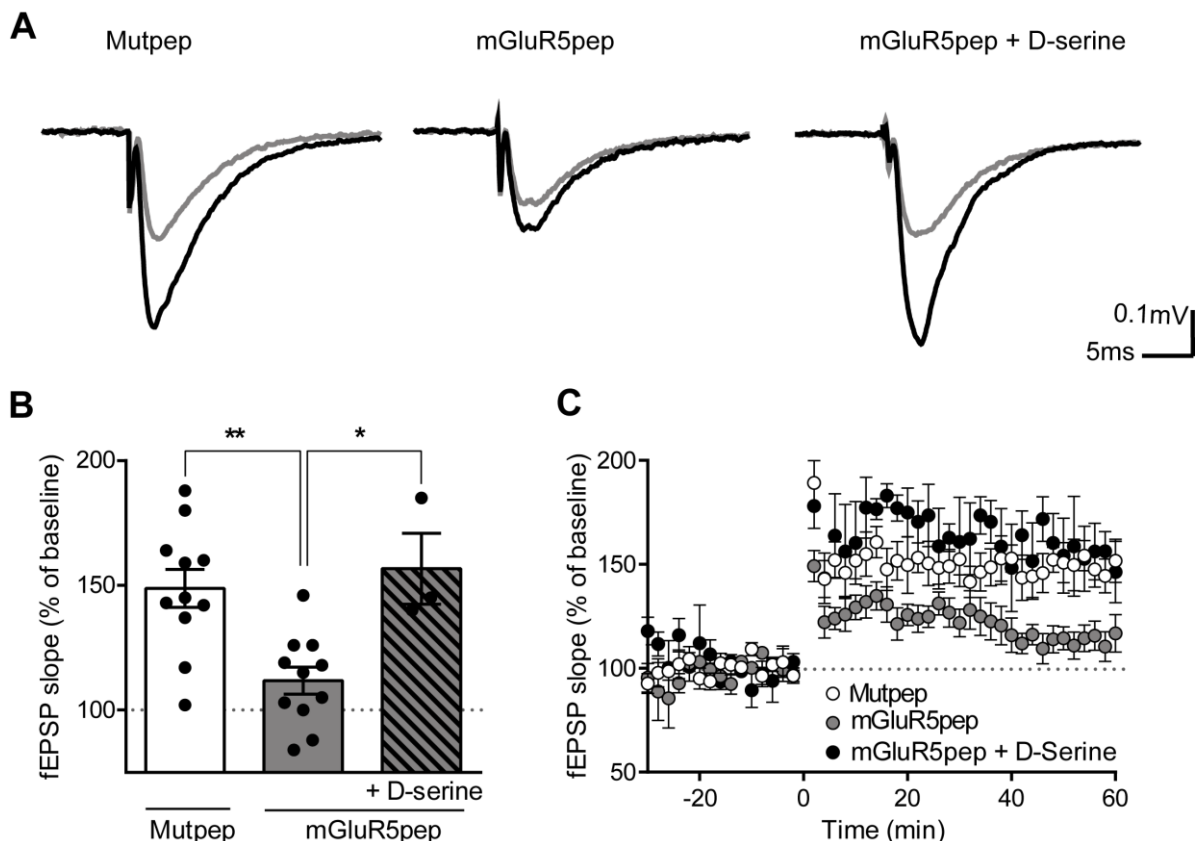


Figure 3 : Le mGluR5 astrocytaire participe à l'induction de la plasticité synaptique à long terme. **A.** Potentiels de champs postsynaptiques excitateurs évoqués (fEPSP) avant (gris) et 50-60 minutes après (noir) l'induction de LTP par un protocole de stimulation téтанique (4 trains de stimulations à 100Hz durant 1s ; 20 secondes d'intervalle entre chaque train à haute fréquence). Traces représentatives pour les groupes contrôle (Mutpep), mGluR5pep et mGluR5pep dont l'ACSF a été supplémenté en D-sérine (100μM). **B.** Histogramme résumant la potentialisation induite par le protocole de LTP pour les groupes contrôle (Mutpep), mGluR5pep et mGluR5pep + D-sérine (100μM). **C.** Représentation de la potentialisation de la transmission (% de la baseline) au cours du temps pour les 3. Les histogrammes et graphiques représentent la moyenne normalisée $\pm$ déviation standard. Test statistique : ANOVA avec test post-hoc de Tukey.

Etude n°2 : Pregnenolone rescued hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory impairments in Ts65Dn Down syndrome mouse model.

Contexte de l'étude

Le syndrome de Down, première cause génétique de déficience intellectuelle, génère entre autre d'importants déficits de mémoire (Patterson, 2009). A ce jour aucun traitement n'existe pour améliorer ces symptômes. Il a récemment été mis en évidence qu'une augmentation de l'activité du récepteur aux endocannabinoïdes de type 1 (CB1), dont l'expression est augmentée dans le SD, pourrait jouer un rôle dans les déficits de mémoire (Navarro-Romero et al., 2019). La prégnénolone, un précurseur hormonal qui joue le rôle d'antagoniste endogène de ce récepteur (Busquets-Garcia et al., 2017; Tomaselli & Vallée, 2019) pourrait être également dérégulé dans le cas du SD. A l'aide des souris Ts65Dn, modèle de SD reproduisant les déficits cognitifs, cette étude vise à comprendre le rôle de la prégnénolone dans la dérégulation du système endocannabinoïde. Cela permettra de déterminer s'il s'agit d'une cible thérapeutique intéressante pour traiter les déficits de mémoire du SD.

Résumé des résultats :

L'équipe du Dr. Revest a mis en évidence par RTq-PCR que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de la prégnénolone était diminuée. De plus, cette diminution est corrélée à une diminution du taux de prégnénolone dans la circulation sanguine.

Par la suite, via une approche comportementale, leurs travaux ont permis de montrer que les déficits de mémoire à court terme et à long terme présents chez les souris Ts65Dn étaient restaurés par la prégnénolone.

Nous avons ensuite voulu savoir si ces altérations de la mémoire étaient corrélées à un déficit de plasticité synaptique à long terme dans la région CA1 de l'hippocampe de souris Ts65Dn âgées de 3 à 4 mois. Pour cela j'ai réalisé des enregistrements électrophysiologiques de potentiels de champs extracellulaires dans la région CA1 de l'hippocampe sur des tranches aiguës de cerveaux de souris contrôles et Ts65Dn âgées de 3 mois. Tout comme pour le comportement, alors que la potentialisation à long terme était diminuée chez les souris Ts65Dn, elle était restaurée par l'application aiguë de prégnénolone.

La signalisation intracellulaire du CB1 étant médiée par la voie Erk1/2 – MAPK, nos collaborateurs ont enfin testé si l'action bénéfique de la prégnénolone pouvait être due au blocage de cette signalisation. Ils ont mis en évidence que le blocage de la voie Erk1/2 – MAPK chez les Ts65Dn compensait leur déficit mémoire.

Contribution

Dans cette étude j'ai réalisé les enregistrements électrophysiologiques qui ont permis de mettre en évidence le déficit de plasticité synaptique à long terme et chez les souris Ts65Dn ainsi que sa compensation par l'application de prégnénolone.

Pregnenolone rescued hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory impairments in Ts65Dn Down syndrome mouse model

Nadia Di Franco^{1†}, Guillaume Drutel^{1†}, **Dorian Arnouil**¹, Pierre-Louis Raux¹, Valérie Roullot-Lacarrière¹, Valérie Lalanne¹, Thierry Leste-Lasserre¹, Isabelle Matias¹, Agnès Grel¹, Miguel Mondésir¹, Delphine Gonzales¹, Stéphane Olié¹, Aude Panatier¹, Pier Vincenzo Piazza², Monique Vallée^{1†*} and Jean-Michel Revest^{1†*}.

¹Univ. Bordeaux, INSERM, Neurocentre Magendie, U1215, F-33000 Bordeaux, France

² Current address: AelisFarma, F-33077 Bordeaux, France.

† These authors contributed equally to this work

* To whom correspondence should be addressed: E-mail: jean-michel.revest@inserm.fr; (ORCID ID: 0000-0001-6459-0888) and monique.vallee@inserm.fr; (ORCID ID: 0000-0002-3642-4257)

SUMMARY STATEMENT

The paper highlights the mechanism of action of Pregnenolone in restoring CB1-dependent synaptic plasticity and memory deficit impairments in Ts65Dn mice.

KEY WORDS

Neurosteroidogenesis system, Pregnenolone (Preg), Type-1 cannabinoid receptor (CB1), Down syndrome (DS), Ts65Dn mouse, Long-term potentiation (LTP), cognitive deficits (CD).

ABSTRACT

Down syndrome (DS), a common genetic disorder characterized by the trisomy of the human chromosome 21 (HSA21), is the primary cause of cognitive deficits (CD). Despite its high incidence, there is currently no pharmacological treatment for the cognitive symptoms hallmark to the disease. Recent studies have suggested a possible role of the endocannabinoid system (ECS) notably the type-1 cannabinoid receptor (CB1) in the etiology of the disease, marking it as a potential therapeutic target. Using the trisomic mouse model Ts65Dn, which shows many relevant features of the disease, including synaptic plasticity and cognitive deficit impairments, we investigated the neurobiological bases underlying CD. We previously demonstrated in Ts65Dn mice an overexpression of CB1 in the dorsal hippocampus, a brain region critically affected in CD. Since the neurosteroid pregnenolone (Preg) was shown to be an endogenous allosteric signaling specific negative modulator of the CB1, the current study aimed to further investigate the mechanism of action of Preg in regulating the CB1 activity on CD in Ts65Dn mice. First, we showed a downregulation of the neurosteroidogenesis system in Ts65Dn mice in particular genes encoding Preg synthesis in the dorsal hippocampus of Ts65Dn mice and a decrease of Preg in the plasma. Second, we demonstrated that *ex vivo* and *in vivo* administration of Preg rescued both synaptic plasticity and CD in Ts65Dn mice, respectively. One of the molecular signatures reflecting the intracellular activity of the CB1 is the phosphorylation and activation of Erk1/2^{MAPK}. Hence, inhibition of Erk1/2^{MAPK} activity restored memory impairment in Ts65Dn mice. Our results suggest that CD in DS could be due to a double deregulation in the dorsal hippocampus, namely an increase in the expression of the CB1 and a decrease in the synthesis of Preg which synergistically induces a pathological hyperactivity of the eCB system through an over-activation of CB1-mediated intracellular signaling. Our results also suggest that Preg could be considered as a valuable therapeutic option to improve CB1-dependent CD in Ts65Dn mice.

INTRODUCTION

Down syndrome (DS) or trisomy 21 is the most common chromosomal abnormality caused by the full or partial triplication of human chromosome 21 (HSA21) (Patterson, 2009). Its etiology starts with developmental abnormalities of varying severity, affecting most organs and organ systems leading to the appearance of numerous physical and neurological deficits. DS subjects are affected by several clinical features, such as craniofacial dimorphism, cardiac malformations, haematology anomalies, immune deficiency and severe intellectual disability displaying an average IQ of 30-40 (Bittles et al., 2007; Gupta et al., 2016; Malinge et al., 2009; Weijerman and de Winter, 2010). Notably, DS patients show learning and memory deficits in hippocampal-related tasks and a strong predisposition to an early development of neurodegenerative diseases (Dierssen, 2012; Hartley et al., 2015; Lott and Dierssen, 2010). While researches advancements have improved patients' life conditions, learning impairments and cognitive deficits (CD) remain the limiting factor for everyday life. Several mechanisms have been suggested to underlie these CD, including alterations in hippocampal synaptic plasticity generated by an excitatory/inhibitory imbalance of neuronal circuits and also a deficit in adult hippocampal dentate gyrus new born cells (Clark et al., 2006; Kleschevnikov, 2004).

Numerous studies agree that the neurobiological bases of this pathology are multifactorial and are thought to be the result of gene-dosage imbalance and altered gene-environment interactions (Antonarakis, 2017; Beach et al., 2017) together with chromatin posttranslational deregulation (Hervé et al., 2016; Letourneau et al., 2014; Mendioroz et al., 2015). HSA21 mouse ortholog genes are distributed in the mouse chromosomes Mmu17, Mmu16 and Mmu10. Genetic engineering has allowed the generation of multiple DS mouse models to assess the genotype-phenotype relationship in DS to test new therapeutic solutions. In this study, we used the Ts65Dn mouse model of DS, created by Mmu16 distal region translocation into Mmu17 centromere (Davisson et al., 1993). Despite the reported weaknesses (Herault et al., 2017), the Ts65Dn mouse model is currently the one with the best face validity to study preclinical drugs evaluations as it recapitulates the majority of phenotypes observed in DS, including learning and memory deficits impairments (Escorihuela et al., 1998;

Martínez-Cué et al., 2002; Reeves et al., 1995). In addition, converging conclusions using several DS mouse models highlight the hippocampus (HPC) as a key structure for many types of memory where neuroanatomical and functional dysfunctioning are observed (Aylward et al., 1999; Guidi et al., 2008; Insausti et al., 1998; Kurt et al., 2004; Lorenzi and Reeves, 2006; Teipel et al., 2003).

Understanding the neurobiological mechanism underlying the CD observed in DS is still an open question since no pharmacological treatment is currently available to address these learning and memory deficits.

Interestingly, among the diverse brain targets the endocannabinoid system (ECS) was shown to play a pivotal role affecting hippocampal-dependent CD and synaptic plasticity (Akirav, 2011; Busquets-Garcia et al., 2015; Marsicano and Lafenêtre, 2009; Monory et al., 2015; Puighermanal et al., 2012; Vallée et al., 2014; Zanettini, 2011). The ECS is a complex cell signaling system composed of endogenous endocannabinoid ligands (anandamide, AEA and 2-arachidonoylglycerol, 2-AG) able to activate two main cannabinoid receptors, the type-1 (CB1) and type-2 (CB2) cannabinoid receptors. AEA and 2-AG are tightly regulated by a set of enzymes involved in their synthesis and degradation (Basavarajappa, 2007). Notably, the CB1 has been shown to have a major role in regulating neuronal excitability (Freund et al., 2003), long-term potentiation and memory (Bohme et al., 2000; Busquets-Garcia et al., 2015; Han et al., 2012; Jacob et al., 2012; Monory et al., 2015). Recent evidence has proposed that cognitive processes also affected in DS (Kleschevnikov, 2004; Reeves et al., 1995) could arise from an upregulation of the activity of the ECS system (Lysenko et al., 2014) and in particular that of CB1 (Navarro-Romero et al., 2019). For instance, pharmacological inhibition of CB1 using the CB1 orthosteric antagonist rimonabant (SR141716A) was able to restore hippocampal-dependent memory and synaptic plasticity deficits in DS (Navarro-Romero et al., 2019). In addition, we previously described a selective CB1 expression and distribution according GABAergic and glutamatergic neuronal subtypes within distinct subfields of the dorsal HPC that might account for CD in Ts65Dn mice (Di Franco et al., to be submitted). Furthermore, data from our laboratory also revealed that CB1 activity was tightly regulated by

the neurosteroid Pregnenolone (Preg) (Tomaselli and Vallée, 2019). Indeed, Preg has been shown to act as an allosteric inhibitor of CB1 signaling thus protecting the brain from the harmful effects of an over-activation of the ECS system notably induced by Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) intake (Busquets-Garcia et al., 2017; Vallée et al., 2014) therefore revealing Preg as a new endogenous mechanism regulating CB1 activity.

In this report, we therefore investigated whether Preg deregulation could account in part for the deregulation of CB1 activity in the hippocampus of Ts65Dn mice. The study of its mechanism of action enabled us to consider Preg as a new pharmacological target to improve CB1-dependent synaptic plasticity and memory deficits in Ts65Dn mice.

RESULTS

Downregulation of the neurosteroidogenesis system in Ts65Dn mice

We investigated the role of Preg in the regulation of CB1 activity for the following reasons. First, Preg has been shown to act as a potent endogenous negative allosteric modulator of CB1 activity (Vallée et al., 2014). Second, we previously showed a selective increase in CB1 expression and distribution between the dorsal and ventral part of the hippocampus and within distinct subfields of the HPC (Di Franco et al., to be submitted) that might account for CD in Ts65Dn mice. The biosynthesis of Preg from cholesterol is a multi-step process involving several key enzymes. Cholesterol synthesis from steroidal precursors involves the enzymes lanosterol synthetase encoded by *Lss* gene and hormone sensitive lipase encoded by *Lipe* gene. Finally, cholesterol is then transported into the mitochondria by the translocator protein TSPO encoded by the *Tspo* gene. Conversion of cholesterol to Preg in the mitochondria is achieved by the enzyme cytochrome P450_{scc} encoded by *Cyp11a1* gene (Fig. 1A) (Reddy and Bakshi, 2020; Strushkevich et al., 2011; Vallée, 2016). In the dHPC, qRT-PCR analysis of genes encoding neurosteroidogenesis enzymes revealed a significant decrease for *Cyp11a1* gene in Ts65Dn mice compared to control WT mice. Interestingly, *Lss* gene encoding lanosterol synthase, a key four-ringed intermediate in cholesterol biosynthesis (Strushkevich et al., 2011) also showed a significant decreased expression (Fig. 1B). In the

vHPC, genes encoding neurosteroidogenesis enzymes were unaffected (Fig. 1C). Nevertheless, a non-significant decreasing trend was also observed for the *Cyp11a1* gene encoding P450_{scc}. The lack of significance could be explained by the high degree of variability in raw qRT-PCR data, as the gene is very low expressed in the brain. As a result, these data suggest that the level of circulating Preg might be altered in Ts65Dn mice. In order to assess this hypothesis, we examined the Preg level in the plasma of mice of both genotype (Fig. 2). The result showed that Preg levels were significantly decreased in the plasma of Ts65Dn mice compared to control WT mice.

Effect of Pregnenolone on hippocampal-dependent memory deficits in Ts65Dn mice

We measured CD in two hippocampal-dependent behavioral tasks that showed to be affected in Ts65Dn mice (Faizi et al., 2011; Navarro-Romero et al., 2019). Spontaneous alternation in a Y-maze was measured to analyze the working memory (WM) phenotype in Ts65Dn mice (Fig. 3A-C). Spontaneous alternation is based on the natural propensity of mice to explore novel environment (Miedel et al., 2017). As previously shown (Faizi et al., 2011), our results confirmed a spontaneous alternation deficit in Ts65Dn mice compared with control WT mice (Fig. 3A). We found that systemic pretreatment of control WT mice with Preg (6 mg/kg, s.c.) did not alter behavioral performance *per se* in the spontaneous alternation task (Fig. 3A). Three of the four groups alternated significantly above chance level when comparing their alternation percentages against the reference value of 50%, with the exception of Ts65Dn Veh mice indicating a spontaneous alternation deficit (Fig. 3A). WM deficits in Ts65Dn were not due to a hypolocomotor deficit since the number of total entries in the maze arms was higher than in WT mice (Fig. 3B), and it was not correlated to the alternation performance (Fig. 3C). Alternatively, WM deficits in Ts65Dn mice were not due to hyperlocomotion either since Preg treatment reversed these deficits without altering the motor hyperactivity of these mice (Fig. 3A-C). Our data clearly showed that Preg fully blocked the cognitive impairment in the spontaneous alternation task in Ts65Dn mice (Fig. 3A). We then assessed the effect of Preg on short-(STM) and long-term (LTM) memory in the novel object recognition (NOR) task (Fig.

3D, E). This behavioral paradigm is based on the natural tendency of rodents to explore novel items. Inferences about cognitive performance can be drawn based on the amount of time rodents spent exploring the displayed items (Cohen and Stackman, 2015). Our results showed that when tested 10 min (Fig. 3D) and 24 h (Fig. 3E) after the acquisition reflecting STM and LTM respectively, Ts65Dn mice displayed severe cognitive impairment compared to control WT mice (Fig. 3D, E), confirming also previous results (Navarro-Romero et al., 2019). In addition systemic pretreatment with Preg (6 mg/kg, s.c.) rescued CD of Ts65Dn mice in both NOR tasks, but did not alter behavioral performance in WT mice (Fig. 3D, E), demonstrating that blocking CB1 specifically improves hippocampal-dependent STM and LTM impairments in Ts65Dn mice. In addition, other behavioral outcomes including motor coordination (Fig. S1A), sensory motor gating (Fig. S1B), anxiety-like (Fig. S1C) and depression-like (Fig. S1D) behaviors were not significantly different from control WT mice (Fig. S1), supporting the specificity of the hippocampal-dependent deficits in the cognitive tests.

Pregnenolone rescued hippocampal synaptic plasticity in Ts65Dn mice

Cognitive processes, such as learning and memory has been strongly linked to a cellular process, classically called long-term synaptic plasticity, which corresponds to a persistent modification of the synaptic strength (Bliss and Collingridge, 1993). This synaptic strength can either be persistently increased (long-term synaptic potentiation, LTP) or decreased (long-term synaptic depression, LTD). Interestingly, several studies have revealed that long-term synaptic plasticity, was impaired in the hippocampus of different Down's mouse models and in particular in Ts65Dn (Costa and Grybko, 2005; Siarey et al., 1997), suggesting that an impairment of long-term synaptic plasticity may contribute to the DS cognitive disability. We therefore investigated whether first LTP was impaired in our experimental condition and then investigated whether Preg could also rescue it (Fig. 4). As demonstrated before (Costa and Grybko, 2005), LTP, induced by a tetra burst stimulation protocol at hippocampal CA3-CA1 synapses was impaired in Ts65Dn mice compared to control WT mice treated with vehicle (Fig. 4A, C). As for the behavioral tasks (Fig. 3), LTP was not altered in hippocampal slices

from control WT mice exposed to Preg (100 nM) (Fig. 4B, C). In contrast, we found that the LTP was rescued in Ts65Dn mice by exogenous Preg treatment (Fig. 4B, C) demonstrating that blocking CB1 receptors specifically improved hippocampal synaptic plasticity in Ts65Dn mice.

Inhibition of Erk1/2^{MAPK} activity restored memory impairment in Ts65Dn mice

Evidence might suggest that deregulation of the extracellular signal-regulated kinases 1/2 mitogen activated protein kinase (Erk1/2^{MAPK}) pathway activity could underlie the CD observed in Ts65Dn mice. Indeed, analysis of post-mortem brains of DS patients revealed increased levels of P-Erk1/2^{MAPK} proteins (Swatton et al., 2004; Siddiqui et al., 2008). In addition, an increase in the activity of this pathway on cognitive processes was classically reported in response to the activation of the CB1 receptor by different agonists (Busquets-Garcia et al., 2018; Laprairie et al., 2014; Vallée et al., 2014). In this experiment, we measured whether the activity of this pathway was deregulated in Ts65Dn mice and could account for CD. The results showed a significant increase in Erk1/2^{MAPK} protein phosphorylation in the hippocampus of Ts65Dn mice compared to control WT mice (Fig. 5A, C) while there was no difference in total Erk1/2^{MAPK} between groups (Fig. 5B), thus reflecting an specific increase of Erk1/2^{MAPK} activity. This increase in P-Erk1/2^{MAPK} was abolished by the selective inhibitor of Erk1/2^{MAPK} phosphorylation SL327 (30 mg/kg; Fig. 5A, C). These results suggested that blocking the activation of Erk1/2^{MAPK} should reverse the CD in Ts65Dn mice. In order to assess this hypothesis, we examined the behavioral effects of a systemic injection of SL327 on the Y-maze hippocampal-dependent memory test. As previously shown (Fig. 3A), cognitive performance of Ts65Dn mice was impaired (not different from chance) in this behavioral task (Fig. 5D). Again, WM deficits in Ts65Dn mice were not due to hyperlocomotion since SL327 treatment reversed these deficits without altering the motor hyperactivity of these mice (Fig. 5E). In addition, there was no correlation between spontaneous alternation and the number of arm entries made (Fig. 5F). Finally, CD were abolished following systemic injection of SL327

(Fig. 5D), indicating that CD in Ts65Dn mice are mediated by the activation of the Erk1/2^{MAPK} signaling pathway.

DISCUSSION

CB1 was shown to be a key regulator of synaptic plasticity and memory processes since the activation or blocking of this receptor have a direct impact on these aforementioned processes (Akirav, 2011; Busquets-Garcia et al., 2015; Marsicano and Lafenêtre, 2009; Monory et al., 2015; Puighermanal et al., 2012; Vallée et al., 2014; Zanettini, 2011). In this study, we investigated the mechanism of action of Preg in regulating the CB1 activity on synaptic plasticity and CD in Ts65Dn mice. We found a decrease in plasma levels of Preg together with a decrease of Preg synthesis encoding gene *Cyp11a1* that catalyzes the mitochondrial conversion of cholesterol in Preg in the dorsal HPC of Ts65Dn mice. Consequently, *ex vivo* and *in vivo* administration of Preg rescued synaptic plasticity and memory deficits in Ts65Dn mice, respectively. Furthermore, inhibition of CB1-induced Erk1/2^{MAPK} activity restored memory impairment in Ts65Dn mice.

Functional consequences of Preg downregulation

Long considered an inactive precursor of neurosteroidogenesis, an increasing number of studies are now emerging to support a role for Preg in many biological processes (Busquets-Garcia et al., 2017; Frau et al., 2019; Vallée et al., 2014), including memory. Indeed, the improvement of cognitive performance has been demonstrated in several working memory paradigms (Busquets-Garcia et al., 2017; Melchior and Ritzmann, 1996; Vallée et al., 2014). Our results increment this list by showing that systemic administration of Preg, similar to rimonabant (Navarro-Romero et al., 2019), restored CD in Ts65Dn mice. The neuroactive sulfated form of Preg (Preg-S) has also been implicated in the regulation of mood processes and memory (Porcu et al., 2016; Vallée, 2016; Vallée et al., 2001). Nevertheless our data suggest that the observed effects are specific to Preg and likely not due to Preg-S since the

sulfated form does not cross the blood-brain barrier (BBB) (Liere et al., 2004; Vallée, 2016). BBB passage of Preg-S was shown to require the presence of transporter proteins (Grube et al., 2018). Although Preg-S could be uptake across the BBB in rodents, it would be rapidly metabolized in favor of free Preg (Qaiser et al., 2017). Further studies will required to assessthe impact of transporters on neurosteroid homeostasis in Ts65Dn mice. The present evidence suggested that a lipoidal form of Preg instead of a sulfated form may be related to CD recovery in Ts65Dn mice. In addition, it is unlikely that the pro-mnesic effect of Preg involves other downstream metabolites since in our experimental conditions Preg administration does not increase the levels of other steroids (Vallée et al, 2014). This is consistent with the reported amnesia-like effect of allopregnanolone (Silvers et al., 2003), one of the major steroid metabolites of Preg (Vallée, 2016).

Long-term synaptic plasticity, is believed to be the cellular basis of learning and memory. Therefore LTP is commonly studied to exploresynaptic changes that may underlie learning and memory (Citri and Malenka, 2008). We showed that the improvement of cognitive performance of Ts65Dn mice following Preg administration was accompanied by a rescue of CA3-CA1 LTP. Indeed, exogenous Preg application was sufficient to rescue LTP in Ts65Dn mice. Evidences suggest that our results are consistent with a specific action of Preg in the modulation of CB1-dependent synaptic activity. Indeed, in agreement with a previous study (Navarro-Romero et al., 2019) we showed that CB1 level was increased in the dHPC of Ts65Dn mice (Di Franco et al., to be submitted) and CB1 receptor-deficient mice were previously shown to have increased hippocampal LTP (Bohme et al., 2000; Jacob et al., 2012). Our data extend the previous works of Navarro and colleagues who showed that CB1 pharmacological inhibitionusing the CB1 antagonist rimonabant restored hippocampal synapticplasticity (Navarro-Romero et al., 2019), and of Tanaka and colleagues who showed that *de novo* synthesis of neurosteroids is required for normal synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the rat hippocampus. Indeed, aminoglutethimide (AMG), an inhibitor of P450scc enzyme that inhibits the production of Preg, was shown to decrease LTP induced by high-frequency stimulation (HFS) while bath application of Preg alone almost

completely prevented the AMG-induced depression of the fEPSP recordings (Tanaka and Sokabe, 2012). It has previously been shown that bath application of the CB1 agonist (THC) on the measure of field excitatory postsynaptic currents (fEPSCs) in NAc principal neurons in rat brain slices reliably inhibited synaptic transmission. The effect of THC was reversed when slices were pre-treated with Preg (100 nM) (Vallée et al., 2014). In addition, the exogenous administration of Preg directly on the slice, which cannot be metabolized into its sulfated derivative, reinforces the specificity of the effects of Preg at the expense of Preg-S, suggesting that Preg modulate synaptic functions in the HPC of Ts65Dn mice to promote learning and memory.

We found that inhibition of Erk1/2^{MAPK} activity with SL327, similar to Preg, restored cognitive performance in Ts65Dn mice. Interestingly, an increase in the activity of this pathway has been reported in Down subjects and in DS mouse models (Swatton et al., 2004; Herault et al., 2017; Siddiqui et al., 2008). In addition, Preg was shown to act as an endogenous signaling-specific inhibitor of excessive CB1 receptor signaling to inhibit selective signaling pathways that are triggered by cannabinoids and notably to antagonize the activation of Erk1/2^{MAPK} (Vallée et al., 2014). As a result, our data suggest that the improvement of cognitive performance by Preg may be mediated by a decrease in CB1-dependent Erk1/2^{MAPK} activity. However, we cannot exclude the involvement of other signaling pathways such as mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways. mTOR-controlled signaling pathways regulate many integrated physiological functions of the nervous system including neuronal development, synaptic plasticity, memory storage, and cognition (Bockaert and Marin, 2015). In particular, an early hyperactivation of the mTOR components within the HPC in DS has been observed (Iyer et al., 2014). Interestingly, it has also been reported that the CB1 activation within the HPC also upregulated mTOR pathway and its downstream translational machinery to mediate THC-induced amnesia (Puighermanal et al., 2009). The role played by Preg in inhibiting mTOR activation will require further analysis to be assessed.

Could the decrease in Preg be the consequence of transcriptional deregulation?

We found that the mRNA of Preg synthesizing P450scc enzyme was largely decreased in the dorsal HPC. While it was not significant a decreasing trend in the ventral HPC and in the prefrontal cortex (data not shown) were also observed while the concentration of Preg was decreased in the plasma. Our results prompted for a transcriptional hypothesis of the deregulation of the *Cyp11a1* gene encoding P450scc enzyme, even if this gene is not contained in the HSA21mouse ortholog. *Cyp11a1* gene maps on chromosome 9 (Chr9:58006411-58027023 bp, + strand) in mouse. Among the proteins known to be encoded by HSA21, 31 proteins are transcription factors that may influence the expression of other genes in the genome (Antonarakis, 2017). We propose two transcription factors shown to play a role in DS potentially controlling the transcription of the *Cyp11a1* gene and for which *in silico* analysis of the promoter sequence revealed that they could bind to specific binding sites. These transcription factors are Runx1 (Runt-related transcription factor 1) and Sim2 which genes map on mouse chromosome 16: 92601466-92826074 bp and chromosome 16: 94085104-94127032 bp, respectively. Runx1 encodes a nuclear factor involved in epigenetic mechanisms notably in leukemia (Zaidi et al., 2012). Although Runx1 was shown to play a role in cell fate specification and axonal projections of dorsal root ganglion neurons (Yoshikawa et al., 2007), its implication in behavior or neurological phenotype has never been reported. However, Runx1 was shown to influence chromatin structure and therefore gene accessibility that could explain the decrease of *Cyp11a1* gene in the dorsal HPC and in other brain structure, although not significant (Antonarakis, 2017). The downregulation of the P450scc enzyme could also be explained by the upregulation of Sim2. Indeed, Sim2 was shown to be a potent repressor of transcription in mammalian one-hybrid experiments (Moffett et al., 1997) requiring heterodimerization with an Arnt partner protein to affect transcription of target genes (Kewley et al., 2004). Interestingly, *in silico* analysis of the *Cyp11a1* gene promoter sequences revealed binding sites for Arnt protein suggesting that Sim2 as a member the basic helix–loop–helix/Per-Arnt-Sim homology (bHLH/PAS) group of transcriptional regulators could potentially repress *Cyp11a1* gene transcription. Giving strength to this hypothesis, overexpression of Sim2 in mice and rats displayed similarity with the phenotype of Ts65Dn mice, including long-term

memory deficits as assessed in the water maze and in contextual fear conditioning (Chrast et al., 2000; Ema et al., 1999; Meng et al., 2006). In addition, since it has been demonstrated that CB1 expression is also controlled by a positive transcriptional regulation loop (Laprairie et al., 2014), the loss of the inhibitory regulation of Preg on CB1 could favor the increase in CB1 expression in particular in GABAergic neurons-enriched areas where CB1 expression was shown to be upregulated. Alternatively, the decrease in Preg could also be related to a cellular dilution effect of astrocytes relative to the total number of neurons. As astrocytes are the most active steroidogenic cells in the brain (Mensah-Nyagan et al., 1999; Zwain and Yen, 1999) and given that the number of CB1-expressing inhibitory interneurons is increased in Ts65Dn mice (Chakrabarti et al., 2010), the deficit in Preg production could therefore no longer control CB1 activity, thus leading to CB1 hyperactivation.

Effects of Preg on behavioral working memory paradigms, relevance to humans

We showed that Preg was able to restore cognitive deficits in Ts65Dn mice in Y-maze and NOR working memory paradigms, known to involve the hippocampus (Antunes and Biala, 2012; Faizi et al., 2011; Krauter et al., 2019). These two procedures were chosen because they are based on similar tasks that have been proven in human Down's patients (e.g., Cantab Pattern Recognition Memory) (Edgin et al., 2010; Edgin et al., 2012), and in which DS patients have shown impairments. Y-maze and NOR tests are performed without reinforcements whereas other classically used tests such as Morris water maze (MWM) (Stasko and Costa, 2004) and the conditional fear conditioning (CFC) (Vidal et al., 2012) tests are based on a negative reinforcer, *i.e.* the animals have to learn a task to avoid a punishment. Negative reinforcement-based learnings are not commonly used in humans, mostly trained with positive reinforcers. The Y-maze test measures spontaneous alternation which relies on the natural tendency of mice to explore novelty in a low-stress environment (Faizi et al., 2011; Krauter et al., 2019). The mouse is placed in the center of the maze, spontaneously and freely explores the three arms alternating visits with a preference for the less recently visited arm. The NOR test is also based on innate curiosity of mice to spontaneous novelty preference. Accordingly,

mice explore longer novel objects (Ennaceur, 2010) therefore showing 'recognition' of an object that they have already encountered by exploring it less. These two behaviors assess working memory, which consists of short-term retention of information and organization of that information to implement appropriate behavior. Additionally, NOR test also assess long-term memory, defined as the capacity to store and record information in a long period of time (Cowan, 2008). In addition, spatial orientation in these two behavioral tasks relied on a self-centered process where the mouse uses its own body as a reference point in the spatial environment for which Down subjects were shown to be deficient (Edgin et al., 2010; Edgin et al., 2012; Robbins et al., 1994). Our results suggest that Preg might have a good therapeutic efficacy in clinical phase studies in patients with Down syndrome.

Preg as a therapeutic target: limitations and solution

We previously showed that Preg was a signalling-specific CB1 receptor inhibitor since it reverts a wide range of acute consequences of THC including memory impairments that resemble acute cannabis intoxication and related psychosis state (Busquets-Garcia et al., 2017; Vallée et al., 2014). In addition, since systemic injections of rimonabant (Navarro-Romero et al., 2019) or Preg used in this study fully blocked the CD in Ts65Dn, our results thus support that the aforementioned Preg effect in hippocampal-dependent memory tasks is mediated by the activation of CB1 receptors. Nevertheless, an assessment in these behavioural effects of the potential involvement of other brain regions, including the prefrontal cortex which is another key structure underlying the CD observed in DS (Rowe et al., 2006) and different cell populations in the brain will require further studies. In addition, it is also worth considering that the plasma Preg decrease could have a larger impact notably on other pathologies for which variations in Preg levels have been observed. Indeed, preclinical and clinical data have shown a specific role for Preg in the pathophysiology of stress and drug abuse disorders, including anxiety, major and post-partum depression, premenstrual syndrome, post-traumatic stress disorders and on disorders related to alcohol and cannabis

abuse, including psychoses such as schizophrenia (Tomaselli and Vallée, 2019; Vallée, 2016) which could predispose Down patients to the development of this type of pathology.

Targeting Preg represents a promising therapeutic option since CB1 receptor orthosteric antagonists such as rimonabant by inhibiting the entire CB1 activity are clinically incompatible as a cognitive disorder therapy due to their adverse effects (Christensen et al., 2007; Seely et al., 2012). Although Preg has a suitable therapeutic pharmacological profile, it cannot be used as a medication, mainly due to its downstream steroid metabolism. Preg has three main drawbacks: 1) it has a very short half-life (20 min), which is a drawback for therapeutic use, 2) it is converted in other active steroids (i.e. progesterone, testosterone...) which may target other receptors and induce toxicological side effects, and 3) it has extremely poor bioavailability after oral administration, which is a major obstacle for oral treatment in humans. To overcome these issues C3-C17 non-metabolized synthetic Preg analogs, named AEF compounds, were developed in collaboration with the biotech *AelisFarma* and protected by INSERM patents (RU2667065C2;US20140200200A1; EP3669876A1). AEF compounds maintain the pharmacological properties of Preg against CB1 but with an upgraded and further strengthened therapeutic profile. Indeed, AEF compounds have an increase half-life, are not metabolized in steroid hormones and have a very good bioavailability after oral administration. For example, a C3-C17 analog of Preg is currently in phase II clinical trial for CUD indication (ClinicalTrials.gov; Identifier NCT03717272; Effect of AEF0117 on Subjective Effects of Cannabis in CUD Subjects). Therefore the present results suggest an additional possible application for AEF in DS.

As a result, the selective CB1 increased expression and distribution according GABAergic and glutamatergic neuronal subtypes within distinct subfields of the dorsal HPC in Ts65Dn mice (Di Franco et al. *to be submitted*) together with a decrease in the synthesis of Preg could account for the pathological hyperactivity of the eCB system underlying synaptic plasticity and CD impairments in DS. In conclusion, our results propose the neurosteroid Preg as a new potential therapeutic option that through a downregulation of CB1-dependent

hippocampal processes improves long-term synaptic plasticity and memory in the trisomic Ts65Dn model.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Three to four months old male Ts65Dn mice (n=122) and control (WT) littermates (n=121) were used. Ts65Dn mice were created by mating female carriers 17¹⁶ chromosome (B6C3H-Ts65Dn) with B6EiC3HF1 hybrid males, obtained by crossing C57BLr/6JEi with C3Hr/HeSnJ mice (Reeves et al., 1995). Different batches of mice were used in these independent experiments: AlphaLISA (WT Veh, n=7; WTSL327, n=8; Ts65Dn Veh, n=7; Ts65Dn SL327, n=8), qRT-PCR (n=8 control and n=6 Ts65Dn), Preg measurement (n=9 control and n=10 Ts65Dn), electrophysiology (n=5 mice per group) assays. For behavioral assays, we used the following group of mice; for Y-maze assay with Preg: WT Veh, n=19; WT Preg, n=17; Ts65Dn Veh, n=19; Ts65Dn Preg, n=19 and with SL327: WT Veh, n=8; WT Preg, n=7; Ts65Dn Veh, n=7; Ts65Dn Preg, n=8; for the STM in the NOR assay with Preg: WT Veh, n=7; WT Preg, n=7; Ts65Dn Veh, n=6; Ts65Dn Preg, n=6 and for LTM in the NOR test with Preg: WT Veh, n=7; WT Preg, n=7; Ts65Dn Veh, n=8; Ts65Dn Preg, n=8. Experiments were performed during the light phase (from 7 am to 7 pm) and animals were kept in collective cages under a 12h light/dark cycle under controls (22°C, 60% humidity) with water and food (A04-10 pellets, Scientific Animal Food & Engineering) *ad libitum*. Animals were acclimated to the housing conditions for two weeks prior to the start of the experiments. One week before the test, mice were isolated in individual cages with a tunnel. Mice were used to be handled in tunnel for 2 days after isolation. During the test mice were handled with their own tunnel. Mice were bred and PCR-genotyped in the Institute.

Chemicals

Pregnenolone (Preg; #164421000, Lot A0302866, Acros Organics, USA) was solubilized in 1% Tween 80 and 2% DMSO in NaCl (0.9%). Preg powder was weighted in an amber glass vial. For each dilution, the solution was well vortexed (5min) at room temperature (RT). The

final solution of 6 mg/kg was agitated for 30-40 min at RT and sonicated for 1h. The day of the experiment, the solution was sonicated again for 1h. The injection of Preg and Vehicle-^{PREG} (1% Tween 80 and 2% DMSO in NaCl (0.9%)) were performed subcutaneously in a volume of 10 ml/kg.

SL327 (#1969/50, Lot n° 4A/219242 Bio-Techne, USA) was solubilized in 2.5% DMSO (Sigma Aldrich, France), 3% Cremophor (#C5135; Lot n°BCBF7085V, Sigma Aldrich, France) and 94.5% injectable water (Brawn; Batch 11426402). After sonication and vortexing, SL327 and Vehicle-^{SL327} (2.5% DMSO, 3% Cremophor and 94.5% injectable water) solutions were administered through intraperitoneal (i.p) route in a volume of 10 ml/kg. The drug was prepared at the doses of 30mg/kg (Kim et al., 2008). Animals received one injection 1h30 min before the test starts. Stock solutions were prepared in DMSO 4% and kept at -20°C.

Pregnenolone measurement

Samples processing. Mice were sacrificed by decapitation. Brains were quickly removed and dHPC and vHPC were then harvested and stored at -80°C until analysis. Blood was drawn into EDTA-coated tubes and centrifuged at 2000 rpm for 15 min at 4°C. Plasma was extracted and stored at -80°C until analysis.

Samples analysis. The extraction and derivatization of Preg were performed as previously described (Vallée et al., 2000; Vallée et al., 2014). Preg was first extracted from plasma and brain samples by a simple solid-phase extraction (SPE) method using reverse-phase C18 columns (Agilent, France). The dried steroid fraction eluted with methanol was derivatized by a two-step procedure. The formation of pentafluorobenzyloxime for negative chemical ionization detection was followed by trimethylsilyl ether formation for adequate sensitivity. Samples were then subjected to isotope-dilution gas chromatography-chemical ionization-tandem mass spectrometric analysis. The derivatized samples were injected (1 µl) directly into a GC/MS/MS XLS Ultra Thermo mass spectrometer (Thermo-Finnigan) via an AS3000 II autosampler. The instrument was employed in negative ion chemical ionization mode and a

15 m Rtx-5Sil MS W/Integra Guard capillary column (Restek, France) with a 0.25 mm inside diameter and 0.1 μ m film thickness was employed for analyte resolution.

To evaluate between-run and within-run accuracy and precision, quality control samples were prepared and intra- and inter-assay coefficients of variation met acceptance criteria (<20%) for pregnenolone. Using calibration curves (linearity $R^2 > 0.99$), the amount of Preg was determined by isotopic-dilution (using deuterium-labelled internal standards containing less than 0.3% of non-deuterated compound).

Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using a standard chloroform/isopropanol protocol and purified by incubation with Turbo DNA-free (Fischer Scientific) (Chomczynski and Sacchi, 1987). The purity and concentration of RNA samples were determined from OD_{260/280} readings using ND1000 UV spectrophotometer (Thermo Scientific) and RNA integrity was determined by capillary electrophoresis using the RNA 6000 Nano LabChip kit run on the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). cDNA was synthesized from 2 μ g of RNA with Maxima RT (Fischer Scientific) using a mix of random primers (Fischer Scientific) and oligo (dT) 18 primers (Fischer Scientific). Transcript-specific primers were generated with Primer Express software (Applied Biosystems) based on GenBank sequence information, verified by NCBI BLAST search, and custom synthesized (Eurogentec). The sequences of all primer pairs can be found in Table 1. Each primers set was tested by melting curve analysis and gel electrophoresis for the absence of primer-dimer artifacts and multiple products. Amplification efficiency of each set was determined by qPCR, using repetitive dilution series of cDNA. Only primers with an efficiency of ~2 were used.

The quantification cycle (C_q) value was measured using the second derivative maximum method implemented in the LightCycler® Real-Time PCR System (Roche Applied Science). For each primer set, a no-template control was performed, and C_q values with a difference <6 cycles were discarded. PCR conditions and LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix (Roche Applied Science) were used in a reaction of 10 μ l, using transcript-specific primers (0.6

μM) and 2 μl cDNA equivalent to 4 ng total RNA input. An initial denaturation step at 95 °C for 5 min was followed by 45 cycles of 95°C for 15 sec, 61°C for 15 sec. The PCR data were exported and analyzed in the informatics tool GEASE (Gene Expression Analysis Software Environment) developed at the Magendie Neurocenter. Relative gene expression levels of the transcripts were analyzed using the comparative Cq method (2- $\Delta\Delta$ CT) implemented in GEASE, as detailed by Livak and Schmittgen (2001) using two reference genes for normalization. The Genorm method was used to determine the reference gene (Vandesompele et al. 2002). Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against reference genes. The reference genes used for the analysis were Eef1a1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), Hprt (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase), Nono (non-POU-domain-containing, octamer binding protein), Sdha (succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A) and Tuba4a (tubulin, alpha 4A). Statistical significance of differences ($p < 0.05$) between experimental groups was determined by the non-parametric two-tailed Mann-Whitney test.

Table 1-Primer sequences.

Transcript	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size	Accession N°
<i>Cyp11a1</i>	5'-ATGACCTGTCAGTGGAACCT-3'	5'-ACTTCAGCCCGCAGCATC-3'	71bp	NM_019179
<i>Lipe</i>	5'-GGGAGTGGGCTGTGCCTTA-3'	5'-TCCCCAGGTTTCAGCTTTT-3'	71bp	NM_010719
<i>Lss</i>	5'-AGAGCAGGCTAGCTTCCAGTTC-3'	5'-GCATGCCTTTAATCCAGCA-3'	71bp	NM_146006
<i>Tspo</i>	5'-TGGCTCCTACATAGTCTGGAAGA-3'	5'-TGTAGAGACCCAAGGGAACCAT-3'	71bp	NM_009775
<i>Eef1a1</i>	5'-TGAACCATCCAGGCCAAATC-3'	5'-GCATGCTATGTGGGCTGTGT-3'	71bp	NM_010106
<i>Gapdh</i>	5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3'	5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTC-3'	100bp	NM_008084
<i>Hprt</i>	5'-AAACAATGCAAACTTTGCTTTCC-3'	5'-CGAGAGGTCCTTTTCACCAGC-3'	88bp	NM_013156
<i>Nono</i>	5'-CTGTCTGGTGCAATTCCTGAACAT-3'	5'-AGCTCTGAGTTCAATTTCCCATG-3'	72bp	NM_023144
<i>Sdha</i>	5'-TACAAAGTCCGGGTCGATGA-3'	5'-TGTTCCCAACGGCTTCT-3'	74bp	NM_023281
<i>Tuba4a</i>	5'-CCACTTCCCTTGGCTACCTA-3'	5'-CCACTGACAGTGCTCATGGT-3'	71bp	NM_009447

Protein extraction from hippocampus and protein quantitation

Extraction of total proteins from mice hippocampus was performed in AlphaLISA SureFire Ultra lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (#P8340 and #P0044, Sigma, USA) using the Precellys 24 homogenizer (a benchtop device for biological samples grinding, lysis, and homogenization; Bertin Technologies, Montigny-le Bretonneux, France). A two cycles homogenizing protocol (30 sec at 5000 rpm) with a 10-sec pause between the

two cycles using ceramic CK14 beads (#03961-1-0032, Bertin Technologies) have been used. Then the samples were centrifuged three times at 10.000 rpm, 10 min at 4°C. Supernatants were kept for quantitation. Total proteins quantitation was done using a Direct Detect X spectrometer that analyses the number of amide bonds (Merck Millipore) by mid-infrared spectroscopy. Then the protein samples were stored at -80°C until use (Zanese et al., 2020).

AlphaLISA Analysis

p-Erk1/2^{T202/Y204} (ALSU-PERK-A10K, and ALSU-PERK-A500), total Erk1/2^{MAPK} (ALSU-TERK-A10K, and ALSU-TERK-A500) levels were quantified using AlphaLISA SureFire Ultra kits, following PerkinElmer's instructions. In an OptiPlate-384 white opaque microplate (PerkinElmer, USA) were poured 10 µl/well of diluted protein samples and 5 µl of acceptor mix (containing both antibodies and Acceptor beads) (Zanese et al., 2020). The plate was sealed with a transparent adhesive film and put at room temperature for one or two hours of incubation for AlphaLISA SureFire Ultra and AlphaScreen SureFire. Then five µl of donor mix (containing Donor beads) were poured into the wells under subdued light (<100 lux). The plate was sealed again, covered with foil, and put at room temperature in the dark for the second incubation of the same duration of the first. Then the plate was read with an Alpha technology-compatible plate reader (EnSpire Alpha plate reader, PerkinElmer) using default AlphaLISA/Screen settings. Alpha measurements were performed in duplicates: each sample was systematically transferred in two independent wells, and the mean Alpha signal value of both wells was used (Zanese et al., 2020). The samples were diluted in lysis buffer at the desired concentration: 0.625 µg of total proteins in 10 µl of lysis buffer was used to measure p-Erk1/2^{T202/Y204} and total Erk1/2^{MAPK}.

Behavioral procedures

Y-maze. Spontaneous working memory was assessed with the Y-maze test (Kraeuter et al., 2019). The Y-maze device consists of 3 identical arms, each arm was 40 cm long, 12 cm high,

3 cm wide at the bottom and 10 cm wide at the top. The arms converged in an equilateral triangular central area. Mice were habituated to the room 1 h before the test begins. An individual mouse was placed in the central area and allowed to move freely in the maze during an 8 min session. An arm entry was counted when all four paws were in the arm. The apparatus was cleaned at the end of each trial (ethanol, 20%). Noldus Ethovision XT12 tracking software was used to draw the three different arms zones (1-2-3), scoring was performed manually. The light in each arm was equivalent (19-23 lux) and higher in the center (24-26 lux). Preg injection was done 30 minutes before the test. Alternation was defined as successive entries into the three arms, on overlapping triplet sets. Spontaneous alternation was calculated as the ratio of actual to possible alternations (defined as the total number of arm entries minus 2) and expressed as a percentage (%). Spontaneous alternation(%) is then calculated with the following formula (Miedel et al., 2017). The mice were sacrificed 30 min later for molecular analysis.

$$\text{Spontaneous alternation (\%)} = \frac{\# \text{ Spontaneous alternation}}{\text{Total number of arm entries} - 2} \times 100$$

Novel object recognition (NOR). Short-term (STM) and long-term (LTM) memory was assessed with the NOR test using two different protocols. The device was a L-maze from Noldus (36cm x 7.2cm x 15cm x 90°angle (LxWxH)) and the illumination was monitored at 25 lux. Both protocols started with a 1st day of habituation in which the mouse explored the maze for 15 minutes (habituation phase). For STM, the second day, the mouse was placed in the same L-maze for 10 min (acquisition phase) where two identical objects were presented (2 marbles or 2 dices). After 10 min (retention time) in the homecage, the mouse was placed again in the same maze for 10 min (test phase) where one object was replaced with a new one (novel object). For LTM, the second day, the mouse explored the L-maze for 10 min (acquisition phase) with the two identical objects, before returning to the homecage. 24h later (retention time), the mouse was placed again in the L-maze for 10 min (test phase) with a novel

object and a familiar one. In both protocols, Preg injection was done immediately after the acquisition phase. The objects used were a red marble (3.5cm of diameter) and a green dice (2.5x2.5x2.5cm). The L-maze and objects were cleaned up with water and then alcohol (20 %) between each mouse.

The time of object exploration was measured both manually and with the Noldus Ethovision XT12 tracking software. We measured the time of exploration as an index of STM (10 min of retention) and LTM (24h of retention) since innate curiosity of the mouse to explore the novelty is a criterion of memory (Antunes and Biala, 2012). Discrimination index is calculated with the following formula.

$$\text{Discrimination index (\%)} = \frac{\text{Time}_{\text{Novel}}}{\text{Time}_{\text{Novel}} + \text{Time}_{\text{Familiar}}} \times 100$$

Elevated plus-maze (EPM). Spontaneous anxiety-like behaviors were measured with the EPM apparatus from Noldus Information Technology; Wageningen, The Netherlands. The apparatus is made of grey polyvinyl chloride and consisted of four elevated arms. The arms (height, 60 cm; length, 37 cm; width, 6 cm; each) were arranged in a cross-like disposition, with two opposite arms being enclosed by walls and the two other arms being open. A video camera placed on the top of the maze and connected to a tracking system allowed the automatic scoring with Ethovision. For the tracking, the maze were divided into 3 zones, open arms, closed arms and center. The light intensity of the maze was set at 43-49 lux (open arms). Mice were placed in the center of the EPM and let free to explore the maze for 5 min. The maze was cleaned up with alcohol (20 %) between each trial. The time spent and the entries number in the open and closed arms were measured. Low percentages of visits and/or of the time spent in open arms reflects an increase in anxiety levels. The total distance moved into the EPM was also monitored as control of general locomotor activity. The ratio of the time in open arm over the total time in the open and closed time is as an index of anxiety levels (Komada et al., 2008).

Rotarod (RO). The test measures motor coordination of mice on a rotating rod. Mice were tested for two consecutive days within five trials *per* day for the first day and four trials *per* day for the second day. The apparatus was cleaned between each trial (ethanol, 20%). An inter-trial time of 5 min was fixed and an increasing speed (5 rpm to 40 rpm or plus 1 rpm every 8 sec) was performed. Motor coordination is measured by the latency to fall in seconds (sec) (Deacon, 2013).

Prepulse inhibition test (PPI). This paradigm is commonly used to evaluate sensorimotor gating as well as attentional processes involved in information selection processing. The SR-LAB startle apparatus with digitized electronic output (SR-Lab, San Diego Instruments, #2325-0400) and Digital sound level meter (FLIR Systems, Extech, #407730) were used as described below (Ioannidou et al., 2018). The protocol was divided in a first habituation period followed by the test session and the apparatus was cleaned at the end of each trial (ethanol, 20%). During the habituation (5 min), the constant background noise of 70 decibel (dB) white noise (depending on the noise of the environment) was displayed. Later, during the test, trials with a startle pulse alone and trials with a prepulse were randomized. Background noise and startle stimulus were the same as in habituation. The prepulse was a white noise of 20 milliseconds (ms) duration. As stimuli, three different prepulse intensities (73, 76 and 82 dB), a pulse of 120dB and an interstimulus interval of 100 ms were used sequentially. Thus, three different prepulse-pulse trials with the startle pulse alone trials were pseudorandomized for 10 times each. Inter-trial intervals were either 20 sec or randomized between 10 and 25 sec. The reaction time to the major stimulus in milliseconds (msec) is an index of sensory motor gating.

Sucrose test preference (STP). This paradigm is a reward-based test to assess anhedonia (decreased ability to experience pleasure), representing one of the core symptoms of depression-like behavior. Mice are interested in sweet foods or solutions. Reduced preference for sweet sucrose solution in SPT represents anhedonia. After a first step of 2-days habituation to avoid side preference (bottles of vehicle and sucrose were placed on the right/left the 1st days and changed from left/right in the 2nd), the test was performed. Mice had free access to

the two different solutions and the choice and volume consumption of sucrose rather than water (sucrose preference) are considered an index of depression-like behaviors. The bottles were filled with 2% sucrose or water as vehicle. The day of the test, the volume consumption was measured at 12am, 4pm, 7pm, 8pm and 10pm. Sucrose preference (%) is expressed as a percentage from 12 am to 10 pm of the sucrose solution consumption over the total consumption (sucrose plus water) (Liu et al., 2018).

Electrophysiological recordings

Slice preparation for electrophysiology. Transverse hippocampal slices were prepared from 3 months old Ts65Dn mice and WT littermate. The day of the experiment, mice were anesthetized with isoflurane (5%) and decapitated. Then, the brain was rapidly removed and immediately placed in ice-cold cutting solution saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. The cutting solution composition was (in mM): 200 Sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 D-Glucose. A block of tissue containing the hippocampus was prepared and transverse acute slices, 350 µm thick were cut on a vibratome (LEICA VT1200S). Slices were transferred in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ maintained at 32°C for 30 min and then placed at room temperature for at least 1h before being transferred to a recording chamber. The aCSF contained (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 D-Glucose

Electrophysiology. Slices were transferred to a submerged recording chamber perfused at 3.5 mL/min with aCSF at 30-32°C for the course of the experiment. Depending on the group aCSF was supplemented with Preg (100nM) or equivalent volume of solvent (DMSO). In order to record extracellular field excitatory post synaptic potentials (fEPSPs) at CA3-CA1 synapses, a glass stimulating and a recording electrode with a resistance of 3 ± 0.5 MΩ were placed in the *stratum radiatum* of the CA1 area, at a distance of at least 100 µm. fEPSPs were recorded with a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments, Inc.) and signals were filtered (2 kHz; Multiclamp 700B) and digitized at (10 kHz; DigiData1550B, Axon Instruments, Inc.). Data were stored for offline analysis using pClamp9 software (Axon Instruments, Inc.).

For LTP experiment, the intensity of the stimulation was set to 40% of the intensity triggering population spikes. Following a stable baseline of fEPSPs evoked at 0.5 Hz (at least 20 minutes), LTP was induced using a theta-burst stimulation (TBS) protocol consisting of 10 trains of 4 pulses at 100 Hz, with an interval of 200 ms from start to start between 2 trains. Then, fEPSPs were evoked at 0.033 Hz (period of 30s) and recorded for 1 hour. Average fEPSP traces presented in figure 4 were obtained from 10 min of recordings, just before the application the TBS protocol and in between 50 and 60 minutes after the application of the TBS.

.Data analysis. Slopes of fEPSPs were measured in the linear part (20-60%) of fEPSPs rise using Clampfit software. Each response, before and after the TBS, was then normalized to the average slope of the last 20 minutes of baseline. The mean of normalized responses of the last 20 minutes of recording (40 – 60 min after TBS) was used to quantify the LTP. Data were expressed as mean $\pm$ standard error (sem).

Statistics

All experiments involving mice were performed according to the protocols approved by the Aquitaine-Poitou Charentes local ethics committee (authorization number APAFIS#26733-2020072417531214 v2) in strict compliance with the French Ministry of Agriculture and Fisheries (authorization number D33-063-096) and European Union Council Directive (2010/63/EU). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of mice used, while maintaining reliable statistics. All experiments were conducted with experimenters blind to genotype; no randomization method for the constitution of the experimental groups was applied. The sample size was chosen to ensure adequate statistical power for all experiments. All values were given as mean $\pm$ s.e.m. and the statistical analysis were performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Correlation test was performed using Pearson's correlation analysis. Non parametric two-tailed Mann-Whitney test was used. For experiments comparing the effects of Preg and SL327, data were analyzed by two-way ANOVA followed, when results were significant, by Tukey's and

Sidak's multiple comparisons *post hoc* test using treatment and genotype as main factors, respectively. Statistical significance was expressed as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and as ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ when different from chance.

Acknowledgements

This work benefited from the support of the Animal Housing and Genotyping (Delphine Gonzales), Analytical chemistry (Isabelle Matias) and Transcriptomic (Thierry Leste-Lasserre) facilities of the Magendie Neurocentre. The 'Biochemistry and Biophysics Facility' of the Bordeaux Neurocampus was funded by the LABEX BRAIN (ANR-10-LABX-43).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was financially supported by INSERM (U121519G), Aquitaine Regional Council, and University of Bordeaux.

Author contributions

Conceptualization: JM.R, M.V; Methodology: N.DF, G.D, D.A, PL.R, V.RL, V.L, T.LL, I.M, A.G, M.M, D.G; Data analysis: JM.R, M.V, G.D, N.DF, A.P, S.O, PV.P; Resources: JM.R; Writing: JM.R, M.V; Supervision: JM.R, M.V; Project administration: JM.R; Funding acquisition: JM.R.

REFERENCES

- Akirav, I.** (2011). The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Front. Behav. Neurosci.* **5**, 1-11.
- Antonarakis, S. E.** (2017). Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 147–163.
- Antunes, M. and Biala, G.** (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* **13**, 93–110.

- Aylward, E. H., Honeycutt, N. A., Barta, P. E. and Jerram, M.** (1999). MRI Volumes of the Hippocampus and Amygdala in Adults With Down's Syndrome With and Without Dementia. *Am J Psychiatry* **5**, 564-568.
- Basavarajappa, B. S.** (2007). Critical Enzymes Involved in Endocannabinoid Metabolism. *Protein Pept. Lett.* **14**, 237–246.
- Beach, R. R., Ricci-Tam, C., Brennan, C. M., Moomau, C. A., Hsu, P., Hua, B., Silberman, R. E., Springer, M. and Amon, A.** (2017). Aneuploidy Causes Non-genetic Individuality. *Cell* **169**, 229-242.e21.
- Bittles, A. H., Bower, C., Hussain, R. and Glasson, E. J.** (2007). The four ages of Down syndrome. *Eur. J. Public Health* **17**, 221–225.
- Bliss, T. V. P. and Collingridge, G. L.** (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39.
- Bockaert, J. and Marin, P.** (2015). mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiol. Rev.* **95**, 1157–1187.
- Bohme, G. A., Laville, M., Ledent, C., Parmentier, M. and Imperato, A.** (2000). Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience* **95**, 5–7.
- Busquets-Garcia, A., Desprez, T., Metna-Laurent, M., Bellocchio, L., Marsicano, G. and Soria-Gomez, E.** (2015). Dissecting the cannabinergic control of behavior: The where matters. *BioEssays* **37**, 1215–1225.
- Busquets-Garcia, A., Soria-Gómez, E., Redon, B., Mackenbach, Y., Vallée, M., Chaouloff, F., Varilh, M., Ferreira, G., Piazza, P.-V. and Marsicano, G.** (2017). Pregnenolone blocks cannabinoid-induced acute psychotic-like states in mice. *Mol. Psychiatry* **22**, 1594–1603.
- Busquets-Garcia, A., Bains, J. and Marsicano, G.** (2018). CB1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology* **43**, 4–20.
- Chakrabarti, L., Best, T. K., Cramer, N. P., Carney, R. S. E., Isaac, J. T. R., Galdzicki, Z. and Haydar, T. F.** (2010). Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat. Neurosci.* **13**, 927–934.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- Chrast, R., Scott, H. S., Papasavvas, M. P., Rossier, C., Antonarakis, E. S., Barras, C., Davisson, M. T., Schmidt, C., Estivill, X., Dierssen, M., et al.** (2000). The mouse brain transcriptome by SAGE: differences in gene expression between P30 brains of the partial trisomy 16 mouse model of Down syndrome (Ts65Dn) and normals. *Genome Res.* **10**, 2006–2021.
- Christensen, R., Kristensen, P. K., Bartels, E. M., Bliddal, H. and Astrup, A.** (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* **370**, 1706–1713.
- Citri, A. and Malenka, R. C.** (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **33**, 18–41.

- Clark, S., Schwalbe, J., Stasko, M. R., Yarowsky, P. J. and Costa, A. C. S.** (2006). Fluoxetine rescues deficient neurogenesis in hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *Exp. Neurol.***200**, 256–261.
- Cohen, S. J. and Stackman, R. W.** (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav. Brain Res.***285**, 105–117.
- Costa, A. C. S. and Grybko, M. J.** (2005). Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: A model of Down syndrome. *Neurosci. Lett.***382**, 317–322.
- Cowan, N.** (2008). What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog. Brain Res.***169**, 323–338.
- Davisson, M. T., Schmidt, C., Reeves, R. H., Irving, N. G., Akesson, E. C., Harris, B. S. and Bronson, R. T.** (1993). Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.***384**, 117–133.
- Deacon, R. M. J.** (2013). Measuring Motor Coordination in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Di Franco, N., Drutel, G., Roullot-Lacarrière, V., Julio-Kalajzic, F., Lalanne, V., Grel, A., Leste-Lasserre, T., Matias, I., Maitre, M., Gonzales, D., et al.** Neuroanatomical distribution of the CB1 cannabinoid receptor in the hippocampus of the Ts65Dn Down syndrome mouse model. *Submitted*.
- Dierssen, M.** (2012). Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat. Rev. Neurosci.***13**, 844–858.
- Edgin, J. O., Mason, G. M., Allman, M. J., Capone, G. T., DeLeon, I., Maslen, C., Reeves, R. H., Sherman, S. L. and Nadel, L.** (2010). Development and validation of the Arizona Cognitive Test Battery for Down syndrome. *J. Neurodev. Disord.***2**, 149–164.
- Edgin, J. O., Mason, G. M., Spanò, G., Fernández, A. and Nadel, L.** (2012). Human and mouse model cognitive phenotypes in Down syndrome. In *Progress in Brain Research*, pp. 123–151.
- Ema, M., Ikegami, S., Hosoya, T., Mimura, J., Ohtani, H., Nakao, K., Inokuchi, K., Katsuki, M. and Fujii-Kuriyama, Y.** (1999). Mild Impairment of Learning and Memory in Mice Overexpressing the mSim2 Gene Located on Chromosome 16: An Animal Model of Down's Syndrome. *Hum. Mol. Genet.***8**, 1409–1415.
- Ennaceur, A.** (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res.***215**, 244–254.
- Escorihuela, R. M., Vallina, I. F., Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobeña, A., Flórez, J. and Fernández-Teruel, A.** (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci. Lett.***247**, 171–174.
- Faizi, M., Bader, P. L., Tun, C., Encarnacion, A., Kleschevnikov, A., Belichenko, P., Saw, N., Priestley, M., Tsien, R. W., Mobley, W. C., et al.** (2011). Comprehensive behavioral phenotyping of Ts65Dn mouse model of Down Syndrome: Activation of β 1-adrenergic receptor by xamoterol as a potential cognitive enhancer. *Neurobiol. Dis.***43**, 397–413.
- Frau, R., Miczán, V., Traccis, F., Aroni, S., Pongor, C. I., Saba, P., Serra, V., Sagheddu, C., Fanni, S., Congiu, M., et al.** (2019). Prenatal THC exposure produces a

- hyperdopaminergic phenotype rescued by pregnenolone. *Nat. Neurosci.***22**, 1975–1985.
- Freund, T. F., Katona, I. and Piomelli, D.** (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.***83**, 1017–1066.
- Grube, M., Hagen, P. and Jedlitschky, G.** (2018). Neurosteroid Transport in the Brain: Role of ABC and SLC Transporters. *Front. Pharmacol.***9**, 1-9.
- Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtieri, F., Ciani, E. and Bartesaghi, R.** (2008). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol. Zurich Switz.***18**, 180–197.
- Gupta, M., Dhanasekaran, A. R. and Gardiner, K. J.** (2016). Mouse models of Down syndrome: gene content and consequences. *Mamm. Genome***27**, 538–555.
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D. N., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., et al.** (2012). Acute Cannabinoids Impair Working Memory through Astroglial CB1 Receptor Modulation of Hippocampal LTD. *Cell***148**, 1039–1050.
- Hartley, D., Blumenthal, T., Carrillo, M., DiPaolo, G., Esralew, L., Gardiner, K., Granholm, A.-C., Iqbal, K., Krams, M., Lemere, C., et al.** (2015). Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.***11**, 700–709.
- Herault, Y., Delabar, J. M., Fisher, E. M. C., Tybulewicz, V. L. J., Yu, E. and Brault, V.** (2017). Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. *Dis. Model. Mech.***10**, 1165–1186.
- Hervé, B., Coussement, A., Gilbert, T., Dumont, F., Jacques, S., Cuisset, L., Chicard, M., Hizem, S., Bourdoncle, P., Letourneur, F., et al.** (2016). Aneuploidy: the impact of chromosome imbalance on nuclear organization and overall genome expression. *Clin. Genet.***90**, 35–48.
- Insausti, R., Juottonen, K., Soininen, H., Insausti, A. M., Partanen, K., Vainio, P., Laakso, M. P. and Pitkänen, A.** (1998). MR volumetric analysis of the human entorhinal, perirhinal, and temporopolar cortices. *AJNR Am. J. Neuroradiol.***19**, 659–671.
- Ioannidou, C., Marsicano, G. and Busquets-Garcia, A.** (2018). Assessing Prepulse Inhibition of Startle in Mice. *Bio-Protoc.***8**, e2789–e2789.
- Iyer, A. M., van Scheppingen, J., Milenkovic, I., Anink, J. J., Adle-Biassette, H., Kovacs, G. G. and Aronica, E.** (2014). mTOR Hyperactivation in down syndrome hippocampus appears early during development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.***73**, 671–683.
- Jacob, W., Marsch, R., Marsicano, G., Lutz, B. and Wotjak, C. T.** (2012). Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo. *Neurobiol. Learn. Mem.***98**, 47–55.
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L. and Chapman-Smith, A.** (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.***36**, 189–204.

- Kim, C. J., Lin, L., Huang, N., Quigley, C. A., AvRuskin, T. W., Achermann, J. C. and Miller, W. L.** (2008). Severe Combined Adrenal and Gonadal Deficiency Caused by Novel Mutations in the Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme, P450_{scc}. *J. Clin. Endocrinol. Metab.***93**, 696–702.
- Kleschevnikov, A. M.** (2004). Hippocampal Long-Term Potentiation Suppressed by Increased Inhibition in the Ts65Dn Mouse, a Genetic Model of Down Syndrome. *J. Neurosci.***24**, 8153–8160.
- Komada, M., Takao, K. and Miyakawa, T.** (2008). Elevated Plus Maze for Mice. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C. and Sarnyai, Z.** (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***1916**, 105–111.
- Kurt, M. A., Kafa, M. I., Dierssen, M. and Davies, D. C.** (2004). Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Res.***1022**, 101–109.
- Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. M., Dupré, D. J. and Denovan-Wright, E. M.** (2014). Type 1 Cannabinoid Receptor Ligands Display Functional Selectivity in a Cell Culture Model of Striatal Medium Spiny Projection Neurons. *J. Biol. Chem.***289**, 24845–24862.
- Letourneau, A., Santoni, F. A., Bonilla, X., Sailani, M. R., Gonzalez, D., Kind, J., Chevalier, C., Thurman, R., Sandstrom, R. S., Hibaoui, Y., et al.** (2014). Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature***508**, 345–350.
- Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Liu, S., Griffiths, W., Schumacher, M., Sjövall, J. and Baulieu, E.-E.** (2004). Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *J. Lipid Res.***45**, 2287–2302.
- Liu, M.-Y., Yin, C.-Y., Zhu, L.-J., Zhu, X.-H., Xu, C., Luo, C.-X., Chen, H., Zhu, D.-Y. and Zhou, Q.-G.** (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat. Protoc.***13**, 1686–1698.
- Lorenzi, H. A. and Reeves, R. H.** (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain Res.***1104**, 153–159.
- Lott, I. T. and Dierssen, M.** (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol.***9**, 623–633.
- Lysenko, L. V., Kim, J., Henry, C., Tyrtysnaia, A., Kohnz, R. A., Madamba, F., Simon, G. M., Kleschevnikova, N. E., Nomura, D. K., Ezekowitz, R. . A. B., et al.** (2014). Monoacylglycerol Lipase Inhibitor JZL184 Improves Behavior and Neural Properties in Ts65Dn Mice, a Model of Down Syndrome. *PLoS ONE***9**, e114521.
- Malinge, S., Izraeli, S. and Crispino, J. D.** (2009). Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood***113**, 2619–2628.
- Marsicano, G. and Lafenêtre, P.** (2009). Roles of the Endocannabinoid System in Learning and Memory. *Curr. Top. Behav. Neurosci.***1**, 201–30.
- Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Lumberras, M., Paz, J., Davisson, M. T., Schmidt, C., Dierssen, M. and Flórez, J.** (2002). Differential effects of environmental enrichment

- on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav. Brain Res.***134**, 185–200.
- Melchior, C. L. and Ritzmann, R. F.** (1996). Neurosteroids block the memory-impairing effects of ethanol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.***53**, 51–56.
- Mendioroz, M., Do, C., Jiang, X., Liu, C., Darbary, H. K., Lang, C. F., Lin, J., Thomas, A., Abu-Amero, S., Stanier, P., et al.** (2015). Trans effects of chromosome aneuploidies on DNA methylation patterns in human Down syndrome and mouse models. *Genome Biol.***16**, 1–26.
- Meng, X., Peng, B., Shi, J., Zheng, Y., Chen, H., Zhang, J., Li, L. and Zhang, C.** (2006). Effects of overexpression of Sim2 on spatial memory and expression of synapsin I in rat hippocampus. *Cell Biol. Int.***30**, 841–847.
- Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G. and Vaudry, H.** (1999). Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.***51**, 63–81.
- Miedel, C. J., Patton, J. M., Miedel, A. N., Miedel, E. S. and Levenson, J. M.** (2017). Assessment of Spontaneous Alternation, Novel Object Recognition and Limb Clasping in Transgenic Mouse Models of Amyloid- β and Tau Neuropathology. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Moffett, P., Reece, M. and Pelletier, J.** (1997). The murine Sim-2 gene product inhibits transcription by active repression and functional interference. *Mol. Cell. Biol.***17**, 4933–47.
- Monory, K., Polack, M., Remus, A., Lutz, B. and Korte, M.** (2015). Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***35**, 3842–3850.
- Navarro-Romero, A., Vázquez-Oliver, A., Gomis-González, M., Garzón-Montesinos, C., Falcón-Moya, R., Pastor, A., Martín-García, E., Pizarro, N., Busquets-García, A., Revest, J.-M., et al.** (2019). Cannabinoid type-1 receptor blockade restores neurological phenotypes in two models for Down syndrome. *Neurobiol. Dis.***125**, 92–106.
- Patterson, D.** (2009). Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum. Genet.***126**, 195–214.
- Porcu, P., Barron, A. M., Frye, C. A., Walf, A. A., Yang, S.-Y., He, X.-Y., Morrow, A. L., Panzica, G. C. and Melcangi, R. C.** (2016). Neurosteroidogenesis Today: Novel Targets for Neuroactive Steroid Synthesis and Action and Their Relevance for Translational Research. *J. Neuroendocrinol.***28**, 12351-12370.
- Puighermanal, E., Marsicano, G., Busquets-García, A., Lutz, B., Maldonado, R. and Ozaita, A.** (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat. Neurosci.***12**, 1152–1158.
- Puighermanal, E., Busquets-García, A., Maldonado, R. and Ozaita, A.** (2012). Cellular and intracellular mechanisms involved in the cognitive impairment of cannabinoids. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.***367**, 3254–3263.
- Kaiser, M. Z., Dolman, D. E. M., Begley, D. J., Abbott, N. J., Cazacu-Davidescu, M., Corol, D. I. and Fry, J. P.** (2017). Uptake and metabolism of sulphated steroids by the blood–brain barrier in the adult male rat. *J. Neurochem.***142**, 672–685.

- Reddy, D. S. and Bakshi, K.** (2020). Chapter 4 - Neurosteroids: Biosynthesis, Molecular Mechanisms, and Neurophysiological Functions in the Human Brain. In *Hormonal Signaling in Biology and Medicine* (ed. Litwack, G.), pp. 69–82. Academic Press.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., Schmidt, C., Bronson, R. T. and Davisson, M. T.** (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.***11**, 177–184.
- Robbins, T. W., James, M., Owen, A. M., Sahakian, B. J., McInnes, L. and Rabbitt, P.** (1994). Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB): A Factor Analytic Study of a Large Sample of Normal Elderly Volunteers. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.***5**, 266–281.
- Rowe, J., Lavender, A. and Turk, V.** (2006). Cognitive executive function in Down's syndrome. *Br. J. Clin. Psychol.***45**, 5–17.
- Seely, K. A., Brents, L. K., Franks, L. N., Rajasekaran, M., Zimmerman, S. M., Fantegrossi, W. E. and Prather, P. L.** (2012). AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology***63**, 905–915.
- Siarey, R. J., Stoll, J., Rapoport, S. I. and Galdzicki, Z.** (1997). Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for down syndrome. *Neuropharmacology***36**, 1549–1554.
- Siddiqui, A., Lacroix, T., Stasko, M. R., Scott-McKean, J. J., Costa, A. C. S. and Gardiner, K. J.** (2008). Molecular responses of the Ts65Dn and Ts1Cje mouse models of Down syndrome to MK-801. *Genes Brain Behav.***7**, 810–820.
- Silvers, J. M., Tokunaga, S., Berry, R. B., White, A. M. and Matthews, D. B.** (2003). Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. *Brain Res. Brain Res. Rev.***43**, 275–284.
- Stasko, M. R. and Costa, A. C. S.** (2004). Experimental parameters affecting the Morris water maze performance of a mouse model of Down syndrome. *Behav. Brain Res.***154**, 1–17.
- Strushkevich, N., MacKenzie, F., Cherkesova, T., Grabovec, I., Usanov, S. and Park, H.-W.** (2011). Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***108**, 10139–10143.
- Swatton, J. E., Sellers, L. A., Faull, R. L. M., Holland, A., Iritani, S. and Bahn, S.** (2004). Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur. J. Neurosci.***19**, 2711–2719.
- Tanaka, M. and Sokabe, M.** (2012). Continuous de novo synthesis of neurosteroids is required for normal synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Neuropharmacology***62**, 2373–2387.
- Teipel, S. J., Schapiro, M. B., Alexander, G. E., Krasuski, J. S., Horwitz, B., Hoehne, C., Möller, H.-J., Rapoport, S. I. and Hampel, H.** (2003). Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome. *Am. J. Psychiatry***160**, 1870–1878.

- Tomaselli, G. and Vallée, M.** (2019). Stress and drug abuse-related disorders: The promising therapeutic value of neurosteroids focus on pregnenolone-progesterone-allopregnanolone pathway. *Front. Neuroendocrinol.***55**, 100789-100803.
- Vallée, M.** (2016). Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.***160**, 78–87.
- Vallée, M., Rivera, J. D., Koob, G. F., Purdy, R. H. and Fitzgerald, R. L.** (2000). Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolone administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.***287**, 153–166.
- Vallée, M., Mayo, W., Koob, G. F. and Le Moal, M.** (2001). Neurosteroids in learning and memory processes. *Int. Rev. Neurobiol.***46**, 273–320.
- Vallée, M., Vitiello, S., Bellocchio, L., Hébert-Chatelain, E., Monlezun, S., Martin-Garcia, E., Kasanetz, F., Baillie, G. L., Panin, F., Cathala, A., et al.** (2014). Pregnenolone Can Protect the Brain from Cannabis Intoxication. *Science***343**, 94–98.
- Vidal, V., García, S., Martínez, P., Corrales, A., Flórez, J., Rueda, N., Sharma, A. and Martínez-Cué, C.** (2012). Lack of behavioral and cognitive effects of chronic ethosuximide and gabapentin treatment in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neuroscience***220**, 158–168.
- Weijerman, M. E. and de Winter, J. P.** (2010). Clinical practice. The care of children with Down syndrome. *Eur. J. Pediatr.***169**, 1445–1452.
- Yoshikawa, M., Senzaki, K., Yokomizo, T., Takahashi, S., Ozaki, S. and Shiga, T.** (2007). Runx1 selectively regulates cell fate specification and axonal projections of dorsal root ganglion neurons. *Dev. Biol.***303**, 663–674.
- Zaidi, S. K., Trombly, D. J., Dowdy, C. R., Lian, J. B., Stein, J. L., van Wijnen, A. J. and Stein, G. S.** (2012). Epigenetic mechanisms in leukemia. *Adv. Biol. Regul.***52**, 369–376.
- Zanese, M., Tomaselli, G., Roullot-Lacarrière, V., Moreau, M., Bellocchio, L., Grel, A., Marsicano, G., Sans, N., Vallée, M. and Revest, J.-M.** (2020). Alpha technology: A powerful tool to detect mouse brain intracellular signaling events. *J. Neurosci. Methods***332**, 108543-108553.
- Zanettini, C.** (2011). Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front. Behav. Neurosci.***5**, 1-21.
- Zwain, I. H. and Yen, S. S.** (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology***140**, 3843–3852.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Expression profile of genes belonging to the neurosteroidogenesis system in the hippocampus of Ts65Dn mice. Schematic illustration of the multi-step enzymatic process leading to the mitochondrial conversion of cholesterol in pregnenolone (Preg) (A). Relative gene expression level of *Cyp11a1* (cytochrome P450scc enzyme), *Lipe* (hormone sensitive lipase), *Lss* (lanosterol synthetase), *Tspo* (TSPO translocator protein) expressed as fold change normalized to control WT mice gene expression in the dorsal (B) and ventral (C) hippocampus. Non-parametric Mann-Whitney test was used, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ compared to control WT group. Plotted values are means $\pm$ sem.

Fig. 2. Pregnenolone level is decreased in the plasma of Ts65Dn mice. Level of pregnenolone was measured in the plasma of Ts65Dn mice using gas chromatography–tandem mass spectrometry. Non-parametric Mann-Whitney test was used, $*p<0.05$ compared to control WT group. Plotted values are means $\pm$ sem.

Fig. 3. Effect of pregnenolone on memory in Ts65Dn mice. (A) Measure of spontaneous alternation in Y-maze test as an index of working memory. (B) Measurement of the number of entries in the maze arms and (C) correlation between spontaneous alternation and the number of arm entries made. Correlation test was performed using Pearson's correlation analysis. Novel object recognition (NOR) test was used to assess short-term (STM, 10 min retention time) (D) and long-term (LTM, 24 h retention time) (E) memory by measuring the time exploring a novel and familiar object using the discrimination index. Groups of mice were control WT (white bar) and Ts65Dn (black bar) mice that received a subcutaneous injection of vehicle (Veh; orange bar) or pregnenolone (Preg; 6 mg/kg; brown bar) solution. Tukey's multiple comparisons *post-hoc* test after ANOVA: $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ compared to Ts65Dn-Vehgroup. $####p<0.001$ when different from chance. Plotted values are means $\pm$ sem.

Fig. 4. Effect of pregnenolone on long-term potentiation (LTP) impairment in Ts65Dn mice. Average time courses of the change in the slope of fEPSP in hippocampal slices from

control WT (white bar) and Ts65Dn (black bar) mice treated with vehicle (Veh; orange bar) (A) or with pregnenolone (Preg; 100 nM; brown bar) (B). Traces represent samples of fEPSPs recorded for each experimental group before and after theta-burst stimulation (TBS). (C) Average LTP of the last 20 min of recordings. Tukey's multiple comparisons *post-hoc* test after ANOVA: * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ compared to Ts65Dn-Veh group. Plotted values are means $\pm$ sem.

Fig. 5. Effect of Erk1/2^{MAPK} inhibition on memory in Ts65Dn mice. Alpha measurement of p-Erk1/2^{MAPK}(A), total Erk1/2^{MAPK}(B), and ratio calculation (p-Erk1/2^{MAPK} over total Erk1/2^{MAPK}) (C) from hippocampus protein extracts of control WT littermates (white bar) and Ts65Dn (black bar) mice intraperitoneally (IP) injected with vehicle (Veh; light blue) or with SL327 (Erk1/2^{MAPK} inhibitor; 30 mg/kg; dark blue).(D) Measure of spontaneous alternation as index of working memory in Y-maze test.(E) Measurement of the number of entries in the maze arms and (F) correlation between spontaneous alternation and the number of arm entries made. Correlation test was performed using Pearson's correlation analysis. Tukey's and Sidak's multiple comparisons *post-hoc* test after ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ compared to Ts65Dn-Veh group. # different from chance; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.005$. Plotted values are means $\pm$ sem.

Fig. S1.Evaluation of the behavioral phenotypes in Ts65Dn mice. Rotarod (RO) for motor coordination (A), prepulse inhibition (PPI) for sensory motor gating (B), elevated plus maze (EPM) for anxiety evaluation (C) and sucrose test preference (STP) for depression-like behaviour (D) were performed to compare Ts65Dn mice to control WT mice. The motor coordination in RO test is indicated with the latency to fall (in seconds, sec) and the sensory motor gating in PPI is expressed as the reaction time to the maximum stimulus (in milliseconds, msec). The anxiety levels in EPM are expressed as percentage (%) of the time spent in open arms over the total time of exploration (open and closed arms). In the STP, anhedonia (inability to feel pleasure) is expressed as percentage (%) of sucrose volume consumption over total

volume drunk. Statistics are performed in Mann-Whitney non parametric test. Plotted values are means $\pm$ sem.

Figure 1

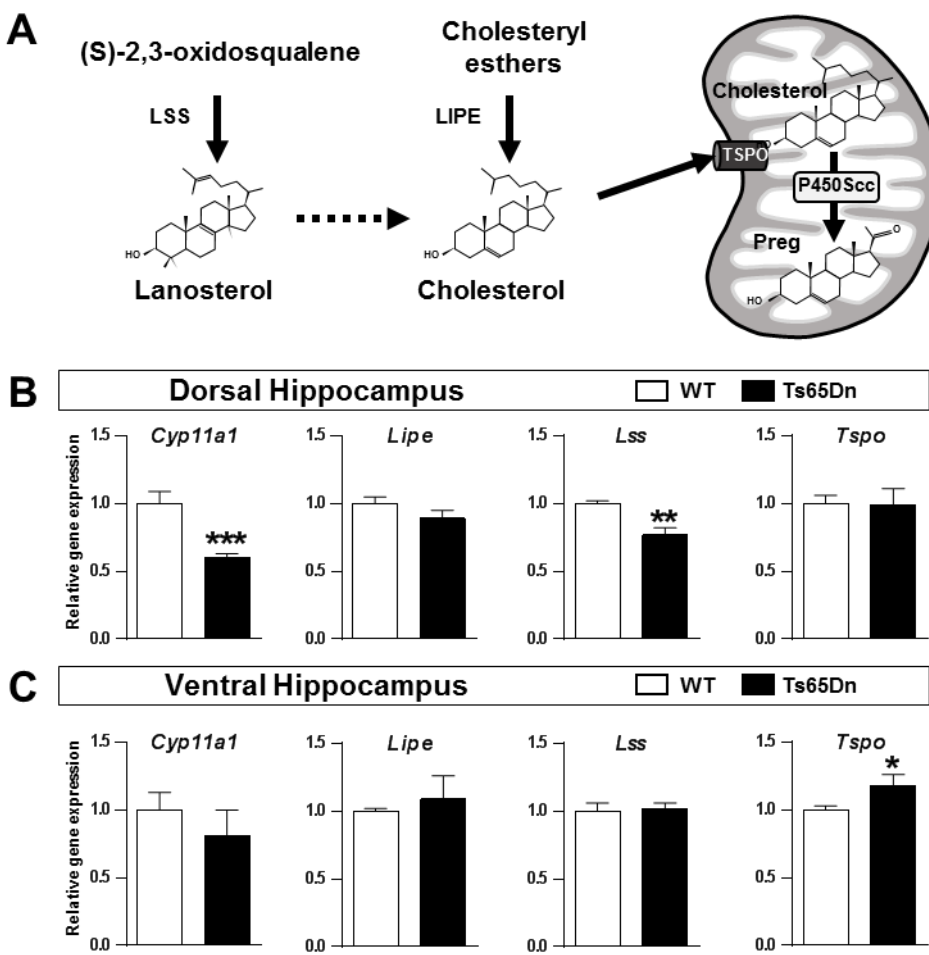


Figure 2

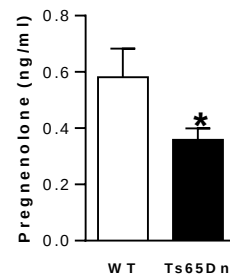


Figure 3

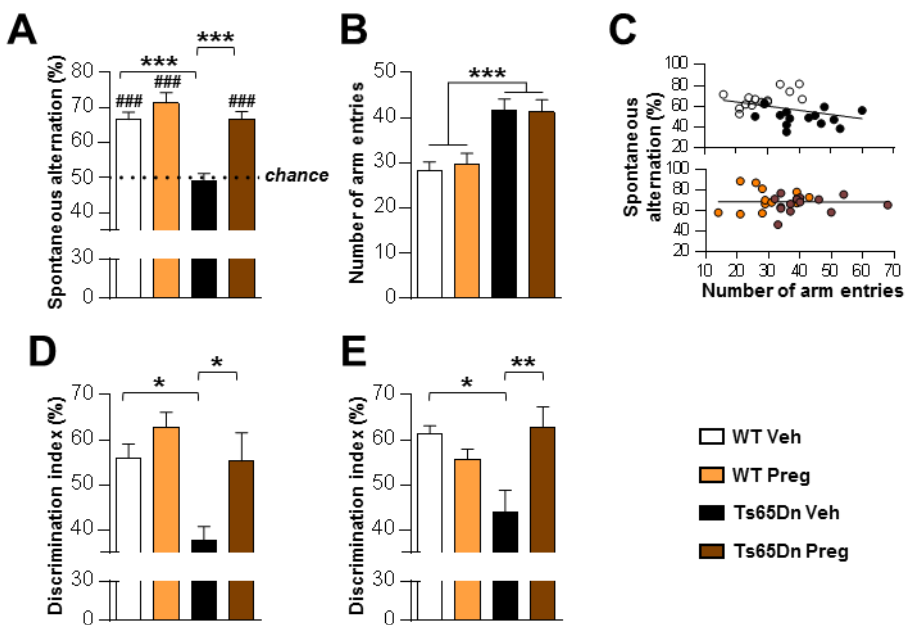


Figure 4

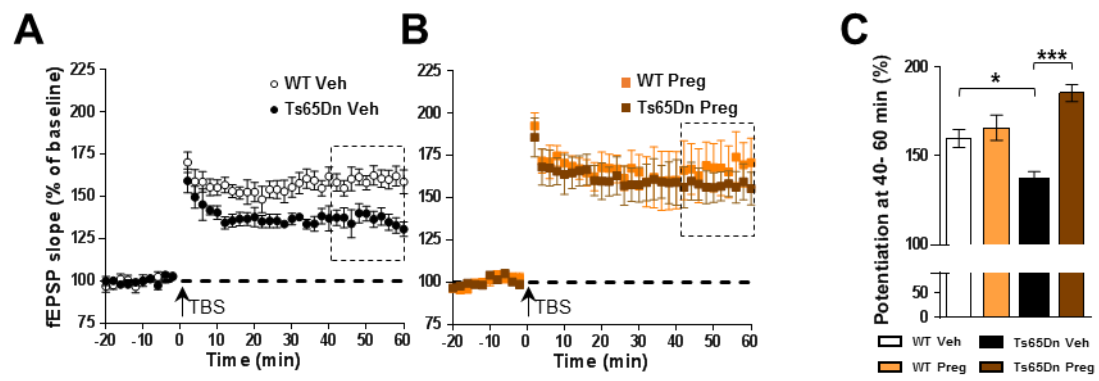


Figure 5

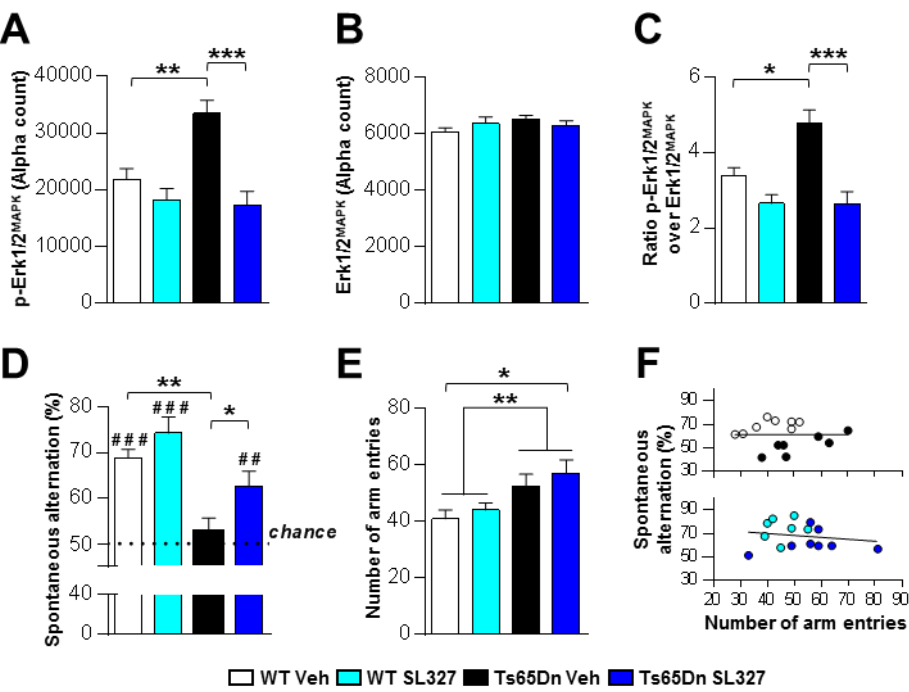
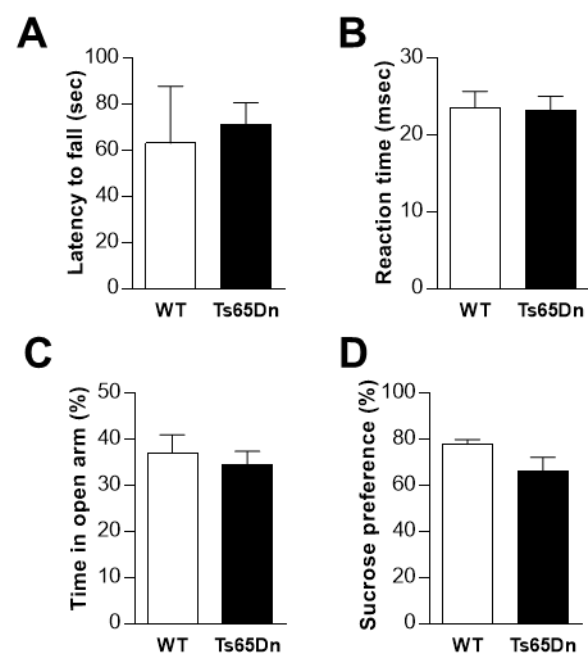


Figure S1



Discussion

Etude n°1 : Astrocytic control of basal synaptic transmission is activity dependent

Résumé des résultats

Cette étude démontre que la potentialisation de la transmission synaptique de base par l'astrocyte impliquant le mGluR5 et le RA_{2A} est toujours présente chez le rat adulte. Cette régulation est dépendante du nombre de synapses activées et est spécifiquement médiée par l'activation du mGluR5 astrocytaire dont l'interaction avec Homer1b/c est nécessaire pour la transduction du signal. De plus, les résultats préliminaires indiquent que le blocage du mGluR5 astrocytaire induit un déficit de LTP qui est compensé par l'apport de D-sérine exogène. Ce résultat suggère que la signalisation du mGluR5 est également importante pour la disponibilité en D-sérine astrocytaire.

Le mGluR5 est exprimé par l'astrocyte adulte

Comme évoqué dans l'introduction, l'expression du mGluR5 dans les astrocytes est régulée au cours du développement. En effet, le niveau d'expression est maximal une semaine après la naissance et chute après la deuxième semaine (Cai et al., 2000; Sun et al., 2013).

Tout d'abord, il est intéressant de noter que ce profil d'expression n'est pas propre aux récepteurs astrocytaires. A l'échelle du SNC, l'expression du mGluR5, tous types cellulaires confondus, est régulée de la même manière : elle est maximale durant la première semaine du développement postnatal puis est réduite d'un facteur 6 environ à l'âge adulte (Casabona et al., 1997; van den Pol et al., 1995). Il est donc très probable que le mGluR5 joue un rôle spécifique au cours du développement, ce qui justifie son haut niveau d'expression. Le mGluR5 est notamment impliqué dans la régulation de la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuraux (Gandhi et al., 2008; Xiao et al., 2013) et il permet la mobilisation des endocannabinoïdes nécessaires à la maturation du réseau (Liang et al., 2014). Le mGluR5 est également important pour la maturation des afférences sensorielles et la synaptogénèse dans le cortex (Wijetunge et al., 2008) etc. En outre, il y a une différence d'expression relative des variants d'épissage entre le juvénile et l'adulte. Le mGluR5a est plus fortement exprimé lors du développement et son expression diminue fortement chez l'adulte au profit du mGluR5b (Minakami et al., 1995). Ce phénomène a également été souligné pour les mGluR5 astrocytaires (Cai et al., 2000). Bien qu'aucune différence n'ait été mise en évidence jusqu'à présent concernant la signalisation intracellulaire des deux variants, on peut émettre l'hypothèse que le mGluR5a serait impliqué dans des mécanismes propres au développement et que le mGluR5b jouerait le rôle de détecteur de la transmission et persisterait à l'âge adulte.

Quoi qu'il en soit, cette diminution de l'expression chez l'adulte amène des questions sur l'évolution du rôle de ce récepteur au cours du développement. En effet, l'importance du mGluR5 pour

la détection de la transmission a d'abord été mise en évidence chez le juvénile (D'Ascenzo et al., 2007; Fiacco & McCarthy, 2004; Panatier et al., 2011). Une étude publiée par Sun et al. (2013) a suggéré que le mGluR5 n'était plus impliqué dans la gliotransmission chez l'adulte. Les auteurs ont étudié l'expression du mGluR5 astrocytaire au cours du développement et ne l'ont pas détecté chez l'adulte. De plus, sur le plan fonctionnel, ils n'ont pas observé de signalisation calcique astrocytaire en réponse à l'agoniste mGluR5. Cependant, ce résultat négatif peut s'expliquer par le fait que les auteurs se sont concentrés sur le corps cellulaire de l'astrocyte. En effet, ils ont utilisé une méthode de cytométrie de flux (FACS-array pour « Fluorescently activated cells sorting » couplé à une analyse de « microarray ») pour évaluer l'expression du mGluR5 ce qui leur a permis d'isoler la population d'astrocytes des autres types cellulaires. Du fait de la morphologie complexe des astrocytes, cette technique n'est pas optimale car elle ne permet pas une bonne préservation des fins processus. Ce constat est très important car il explique la sous-estimation du niveau d'expression des mGluR5. En effet, ces récepteurs sont situés principalement au niveau des fins processus proches des synapses (Arizono et al., 2012; Lavielle et al., 2011) et il a été montré que la transcription de l'ARNm pouvait se faire au niveau local dans les PAPs (Sakers et al., 2017). Cette technique n'a donc probablement pas permis une récupération efficace de l'ARNm, d'autant plus que la complexité de l'arborisation astrocytaire augmente à l'âge adulte (Bushong et al., 2004).

Dans notre étude, nous avons utilisé les techniques de microscopie à haute résolution confocale et STED pour mettre en évidence *in situ* la présence du mGluR5 dans les astrocytes chez l'adulte. Les techniques de FISH et d'immunohistochimie ont permis de détecter l'ARNm et la protéine mGluR5 dans les prolongements astrocytaires. Bien que son expression diminue à l'âge l'adulte, le mGluR5 astrocytaire est donc toujours présent. Ces résultats concordent avec d'autres études qui ont également détecté des mGluR5 dans les processus astrocytaires chez l'adulte localisés principalement au niveau des PAPs (Buscemi et al., 2017; Lavielle et al., 2011).

Le mGluR5 astrocytaire est fonctionnel chez l'adulte

Sur le plan fonctionnel, les auteurs de l'étude Sun et al., 2013 n'ont pas mis en évidence de changement de la signalisation calcique suite à l'application de l'antagoniste du mGluR5. Toutefois là encore, ils se sont concentrés sur le soma de la cellule du fait de la résolution spatiale et temporelle de leur technique. De plus, la fréquence d'acquisition était assez lente (3,3Hz), permettant uniquement de détecter des évènements lents, se propageant le long de l'arborisation astrocytaire, et non des évènements brefs, locaux, au niveau du compartiment astrocytaire en apposition étroite avec les éléments neuronaux de la synapse. Or, il a déjà été montré que l'activation du mGluR5 induit généralement ce type de signalisation cantonnée aux microdomaines (Panatier et al., 2011). De plus, l'étude de Bindocci et al. (2017) démontre grâce à de l'imagerie calcique en trois dimensions que la

signalisation calcique astrocytaire en conditions physiologiques est composée en grande majorité d'évènement brefs et localisés dans les fins processus.

Dans notre étude, nous n'avons pas enregistré la réponse calcique des astrocytes. Cependant, d'autres travaux ont mis en évidence chez la souris et le rat adulte que le blocage du mGluR5 affectait l'activité calcique localisée dans le processus mais pas dans le soma (Lavialle et al., 2011; Tang et al., 2015). De plus, le développement du virus permettant l'expression d'un peptide mGluR5 dominant négatif dans les astrocytes au cours de ma thèse m'a permis de démontrer sur le plan fonctionnel que le mGluR5 astrocytaire influençait toujours la neurotransmission chez l'adulte. En effet, l'occlusion de l'effet de l'antagoniste spécifique du mGluR5 MPEP par la présence du peptide dominant négatif astrocytaire démontre que la modulation de la transmission synaptique de base par l'astrocyte implique spécifiquement l'activation du mGluR5 astrocytaire. Cependant, il serait intéressant de réaliser des expériences d'imagerie calcique sur les animaux ayant été injectés par ce virus pour confirmer que l'activité calcique dans les microdomaines est altérée après le blocage de la signalisation mGluR5 astrocytaire.

Autres moyens de détection de la neurotransmission pour l'astrocyte

Dans notre étude, nous avons montré que le mGluR5 était le récepteur clé pour détecter la transmission glutamatergique. Cependant ce n'est pas le seul mGluR exprimé par les astrocytes, le mGluR3 est également présent. Contrairement au mGluR5, l'expression du mGluR3 reste stable au cours du développement, on pourrait alors se demander s'il pourrait être responsable de la détection du glutamate chez l'adulte. Les données de la littérature suggèrent qu'il n'est pas impliqué dans la gliotransmission (Sun et al., 2013). Le mGluR3 est couplé à une protéine Gi/o qui inhibe l'adénylate cyclase, il n'est donc pas directement couplé à la libération de calcium. Ce récepteur aurait plutôt un rôle protecteur pour les neurones et les astrocytes et sa signalisation permettrait de réguler l'expression des transporteurs au glutamate et de différentes protéines neuroprotectives (Durand et al., 2013; Turati et al., 2020). Une étude récente apporte cependant de nouvelles hypothèses intéressantes sur ses fonctions. Kellner et al. (2021) montrent que le mGluR3 joue un rôle dans la signalisation calcique des voies sensorielles *in vivo*. Bien que la signalisation calcique astrocytaire en réponse à une stimulation sensorielle soit médiée par le mGluR5, il semblerait que les deux récepteurs agissent en synergie et que le mGluR3 potentialise cette signalisation (Kellner et al., 2021).

Outre les mGluR, certains astrocytes de l'hippocampe peuvent exprimer des RNMDA (Letellier et al., 2016) et une étude récente montre que ces récepteurs pourraient être impliqués dans la détection de la transmission synaptique de base (Chipman et al., 2021). Le RNMDA astrocytaire pourrait jouer un rôle dans la détermination de la probabilité de libération des synapses puisque son

blocage réduit l'hétérogénéité de la probabilité de libération. Ce mécanisme semble être indépendant de la régulation médiée par le mGluR5 (Chipman et al., 2021).

La régulation liée à l'astrocyte dépend du nombre de synapses activées

L'enregistrement des potentiels de champs nous a permis d'étudier l'activité synaptique ayant lieu au niveau de synapses voisines appartenant à plusieurs neurones et en interaction potentiellement avec un astrocyte, ou deux astrocytes voisins, dépendamment de l'emplacement de la pipette d'enregistrement. Lors de l'enregistrement des potentiels de champs extracellulaires, nous avons fait varier l'intensité de stimulation afin d'obtenir les réponses synaptiques dépendant de l'activation d'un nombre croissant de fibres présynaptiques. Grâce à ces expériences, dites d'entrée-sortie ou « Input-Output », nous avons pu observer que la régulation de la transmission *via* le mGluR5 astrocytaire n'était présente que pour de faibles intensités de stimulation. Plusieurs interprétations de ce phénomène sont possibles. Lorsque l'intensité de stimulation augmente, le nombre de fibres présynaptiques recrutées est plus élevé ce qui augmente logiquement le nombre de synapses activées au sein du domaine des astrocytes. L'astrocyte pourrait jouer le rôle d'un intégrateur de la transmission et réguler la transmission synaptique dans son domaine de différentes manières en fonction du niveau d'activation du réseau. Plusieurs éléments apportent de la crédibilité à cette hypothèse :

(1) Le type de signalisation calcique dans l'astrocyte dépend de l'intensité de l'activité neuronale. Par exemple, l'application d'une faible concentration de glutamate sur des astrocytes en culture induit une activité calcique brève et localisée. Au contraire, l'application d'une concentration élevée induit une vague calcique propagée dans toute la cellule, voire même un phénomène d'oscillations rythmiques (Cornell-Bell et al., 1990b). *In situ*, il a été montré que la fréquence d'oscillations des événements calciques astrocytaires dépendait de l'activité neuronale (Pasti et al., 1997).

(2) L'astrocyte est à l'origine de phénomènes de plasticité homéostatique permettant le maintien de l'intensité de la transmission dans une gamme physiologique (Wang et al., 2021). D'ailleurs, l'astrocyte peut aussi bien potentialiser une transmission synaptique faible, comme montré dans notre étude, que tempérer une activité neuronale plus intense (Pascual et al., 2005). L'occurrence de ces différents types de régulation de la transmission suggère que la gliotransmission peut être adaptée à l'activité neuronale à l'échelle du domaine. En outre, l'astrocyte est impliqué dans des processus de plasticité hétérosynaptique (Chen et al., 2012; Serrano et al., 2006) ce qui démontre que la détection de l'activité neuronale à une synapse donnée influence la gliotransmission à d'autres synapses. Au niveau du système nerveux périphérique, les cellules de Schwann pérисynaptiques jouent un rôle analogue à celui des astrocytes dans le SNC. Or, il a été montré pour ces cellules que l'activité calcique induite par la

neurotransmission change en fonction du pattern d'activité neuronale et que leur modulation de la transmission est ajustée en conséquence (Todd et al., 2010).

(3) L'astrocyte, de par ses caractéristiques morphologiques, perçoit la transmission à une échelle différente des neurones. En effet, chaque domaine astrocytaire enveloppe plus de 100 000 synapses appartenant à différents neurones. De plus, les astrocytes sont fréquemment couplés à leurs voisins par des jonctions communicantes qui permettent l'échange d'informations entre deux domaines. Les syncytiums astrocytaires ainsi formés correspondent généralement à des unités fonctionnelles sur le plan du réseau (Houades et al., 2008; Roux et al., 2011).

Pour développer cette piste, il serait intéressant de réaliser des enregistrements de potentiels de champs couplés à de l'imagerie calcique afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le changement de la régulation purinergique et l'activité calcique astrocytaire. Dans ces conditions, le patch d'un astrocyte permettrait de manipuler le calcium astrocytaire. Il serait alors possible d'induire une activité calcique en réalisant un « décaage » de calcium ou d'IP₃, ou au contraire de bloquer sa propagation par l'ajout d'un chélateur (Agulhon et al., 2008; Crowe et al., 2010; Shigetomi et al., 2008). Cela permettrait de déterminer si les changements de la signalisation calcique sont la cause de l'arrêt de la régulation purinergique.

Développement d'un virus permettant le blocage de la signalisation mGluR5 astrocytaire

L'application aiguë d'agonistes et d'antagonistes spécifiques sur les tranches est une méthode très efficace pour déterminer le rôle d'un récepteur dans la régulation de la transmission. Grâce à cette approche, nous avons pu démontrer l'implication des mGluR5 et des RA_{2A} dans la régulation étudiée. Le principal défaut de la pharmacologie est l'absence de sélectivité au niveau du type cellulaire. Ainsi, le mGluR5 étant également exprimé par les neurones (Romano et al., 1995), la pharmacologie à elle seule n'est pas suffisante pour déterminer s'il s'agit du mGluR5 astrocytaire. Les expériences d'enregistrement de potentiels de champs au travers du patch astrocytaire nous ont permis de bloquer la signalisation calcique astrocytaire par infusion d'un chélateur du calcium et de démontrer l'implication de l'astrocyte dans cette régulation. Toutefois, cette approche ne prouve pas de manière directe l'implication des mGluR5 astrocytaires. En effet, il est possible que l'astrocyte soit un intermédiaire à l'activation des mGluR5 neuronaux (Kanno & Nishizaki, 2012). Pour pallier ce problème, nous avons décidé de développer un virus permettant l'expression d'un peptide mGluR5 dominant négatif sous le contrôle d'un promoteur astrocytaire, ce qui a permis de bloquer la signalisation mGluR5 spécifiquement dans les astrocytes de l'hippocampe.

Il est important de noter que ce virus n'empêche pas l'expression du mGluR5 mais qu'il bloque sa signalisation. En effet, le vecteur viral permet d'induire l'expression d'un peptide sous le contrôle

du promoteur astrocytaire gfaABC1D. Le peptide exprimé, qui correspond à la partie C-terminale du mGluR5, sature les sites de liaison de la protéine Homer 1b/c. Sans l'interaction avec cette protéine, le mGluR5 ne peut pas se positionner dans la zone stratégique du PAP permettant la détection du glutamate. De plus, il ne se trouve plus à proximité du RE, alors que cela est nécessaire à sa signalisation intracellulaire (Buscemi et al., 2017).

Cette stratégie que nous avons adoptée présente plusieurs avantages. Tout d'abord, les virus ont été injectés au niveau de la zone d'intérêt 4 semaines après la naissance, alors que le niveau d'expression du mGluR5 est stabilisé après le pic d'expression développemental. Cela permet d'éviter d'affecter un processus développemental dans lequel le mGluR5 pourrait être impliqué et qui ne serait pas spécifique de la signalisation étudiée. L'un des autres avantages est le fait que cette stratégie de blocage de la signalisation mime un processus physiologique. En effet, le blocage de la signalisation mGluR5 existe naturellement dans les neurones et les astrocytes de l'hippocampe par l'expression de Homer 1a (Buscemi et al., 2017). Ce dernier empêche l'interaction entre le mGluR5 et Homer 1b/c, tout comme le peptide mGluR5dn. Or, l'expression de Homer 1a dans les astrocytes et dans les neurones bloque la signalisation mGluR5. En plus d'apporter du crédit à l'efficacité du mGluR5dn dans le blocage de la signalisation mGluR5 astrocytaire, cela indique également que cette approche ne devrait pas être délétère pour la cellule ou induire un blocage de la transmission par un mécanisme non spécifique.

Un tel blocage de la transmission est présent par exemple chez les souris transgéniques KO pour la connexine 30 astrocytaire. L'absence de cet hémicanal induit une invasion de la synapse par le PAP, ce qui maximise la recapture du glutamate et altère globalement la transmission synaptique de base (Pannasch et al., 2014). Ce phénomène serait notamment dû à la disparition de l'interaction entre la Connexine 30 et le cytosquelette qui maintient le PAP (Pannasch et al., 2014; Qu et al., 2009). Il est très peu probable qu'un phénomène semblable se produise dans notre situation. D'ailleurs, la transmission synaptique de base pour des stimulations importantes a été mesurée lors des expériences de LTP et elle n'est pas altérée chez les animaux exprimant le peptide dominant négatif. Cela montre qu'il n'y a pas de blocage de la transmission synaptique non spécifique du mGluR5 (Figure complémentaire 1).

En outre, la stratégie du blocage de l'interaction du mGluR5 avec Homer1b/c a déjà été utilisée dans des études antérieures. Le peptide mGluR5 C-terminal a initialement été développé par Mao et al. (2005) et plusieurs études ont démontré que ce peptide bloquait efficacement la signalisation mGluR5 (Mao et al., 2005; O'Riordan et al., 2014; Ronesi et al., 2012; Tronson et al., 2010). Dans sa version initiale, le peptide était composé de la partie C-terminale du mGluR5 associée à une séquence

TAT lui permettant de passer la membrane des cellules (Mao et al., 2005). Il pouvait donc être appliqué directement sur les tranches d'hippocampe par exemple, mais n'était pas spécifique du type cellulaire. Nous avons décidé d'utiliser la même séquence sans la partie TAT et de l'administrer par l'intermédiaire du vecteur viral pour que le blocage soit spécifique des astrocytes. Le promoteur gfaABC1D que nous avons utilisé pour son expression est spécifique des astrocytes (Lee et al., 2008). Malgré tout, il est important de s'assurer que le peptide est présent uniquement dans les astrocytes. Des expériences d'immunohistochimie sont actuellement en cours au laboratoire pour tester la colocalisation du peptide avec les astrocytes et les neurones.

Cette technique présente tout de même un inconvénient car elle n'apporte pas de certitude sur la spécificité du blocage. En effet, en interagissant avec Homer 1b/c le peptide pourrait indirectement affecter d'autres effecteurs qui lient cette protéine. Cependant, l'occlusion de l'effet du MPEP (antagoniste spécifique du mGluR5) indique que dans nos conditions expérimentales le seul effet observé est médié par le mGluR5. En outre, les autres études ayant utilisé la séquence C-terminale mGluR5 pour bloquer l'interaction mGluR5 – Homer1 n'ont pas détecté d'effets aspécifiques. D'ailleurs l'étude O'riordan et al. (2014) montre que l'application de MPEP ou du peptide mGluR5 C-terminal – TAT reproduit le déficit de plasticité observé chez les souris transgéniques Homer1c KO.

La modulation purinergique de la transmission via le mGluR5 semble spécifiquement impliquer les récepteurs à l'adénosine présynaptiques

Lors des expériences de stimulations minimales, les courants observés sont théoriquement dus à l'activation d'une seule synapse. Le pourcentage d'échec d'induction d'un courant dépend donc de la probabilité de libération de la synapse en question. La mesure du taux d'échec est le moyen le plus fiable de déterminer la probabilité de libération. En revanche, lorsque la stimulation recrute plusieurs synapses le courant observé est une sommation de leur activité. Dans ce cas, une modulation pré- ou postsynaptique induit une variation d'amplitude. Dans ces expériences, nous avons utilisé un protocole de stimulations appariées afin de tester le locus impliqué. Le calcul du ratio entre les deux réponses permet de déduire la probabilité de libération.

De manière surprenante, nous n'avons pas observé de différence au niveau du PPR lors de l'application d'antagoniste mGluR5 pour des stimulations intermédiaires. Ce résultat diffère de ce que nous avons observé avec les stimulations minimales mais doit être considéré avec prudence. En effet, le PPR est très utile pour donner une indication sur le locus de la modulation mais il s'agit d'un moyen indirect d'évaluation qui est moins fiable que le taux d'échec (Manita et al., 2007). En effet des études suggèrent que certains type de PPF pourraient impliquer le locus postsynaptique ce qui fausserait la mesure de la probabilité de libération (Akopian & Walsh, 2002; Clark et al., 1994). En accord avec cela,

une étude mesurant le PPR via l'activité des transporteurs au glutamate astrocytaires montre la facilitation n'est pas toujours corrélée à un changement du taux de glutamate libéré (Manita et al., 2007). Bien que le PPR ne soit pas un indicateur totalement fiable, on ne peut pas exclure la possibilité que les gliotransmetteurs agissent effectivement au niveau postsynaptique lorsque la stimulation augmente. En effet, l'ATP libéré par l'astrocyte pourrait par exemple agir sur les récepteurs P2X postsynaptiques (Pankratov et al., 1998). Afin de tester cette hypothèse, j'ai bloqué pharmacologiquement les P2X à l'aide de l'antagoniste non spécifique TNP-ATP. Ce blocage a entraîné une diminution de l'amplitude de la réponse synaptique sans affecter le PPR. Cela indique que les P2X postsynaptiques sont activés au cours de la transmission de base dans nos conditions expérimentales, ce qui est en accord avec la littérature (Mori et al., 2001; Pankratov et al., 1998). Afin de tester si l'activation des mGluR5 astrocytaires conduisant à la libération de purines était à l'origine de cet effet, j'ai effectué cette expérience sur l'hippocampe de rats exprimant le peptide mGluR5 dominant négatif astrocytaire. L'effectif actuel est faible (n=3) et ne permet pas de tirer de conclusion définitive mais les résultats préliminaires vont dans le sens d'une diminution induite par le TNP-ATP dans des proportions similaires au groupe contrôle.

Ce résultat, s'il se confirme, indiquerait que le mGluR5 astrocytaire n'est pas impliqué dans l'activation des P2X. Bien que ce résultat ne permette pas d'expliquer l'absence de modification du PPR lors de l'application du MPEP pour des stimulations moyennes, il reste très intéressant car il souligne la spécificité de la voie de signalisation étudiée. En effet, comme indiqué dans l'introduction, les purines ont de nombreuses cibles au niveau des synapses glutamatergiques. Ce résultat suggère que les récepteurs purinergiques au niveau des différents loci peuvent être activés de manière spécifique par des sources distinctes. Cette hypothèse avait déjà été avancée pour justifier la présence des RA₁ et RA_{2A} au niveau des mêmes terminaux présynaptiques alors que leur signalisation est opposée (Rebola et al., 2005).

La signalisation mGluR5 est importante pour la régulation de la LTP

Le mGluR5 joue un rôle important dans la plasticité à long terme. En effet, les souris transgéniques mGluR5 KO n'exprimant pas le mGluR5 ont un déficit de LTP dépendant du RNMDA dans l'hippocampe (Lu et al., 1997). De surcroît, l'activation du mGluR5 par un modulateur allostérique peut potentialiser la LTP (Ayala et al., 2009). L'interaction avec les isoformes longs de Homer1 est nécessaire à la signalisation du mGluR5 et cela se confirme pour son rôle dans l'induction de la LTP. En effet, les souris transgéniques KO pour Homer 1c présentent le même déficit de LTP que les mGluR5 KO (Gerstein et al., 2012). De manière intéressante, ce déficit est également reproduit par l'application du peptide mGluR5 C-terminal – TAT (O'Riordan et al., 2014). Le déficit de LTP que j'ai observé chez les

animaux exprimant le peptide mGluR5 dominant négatif dans les astrocyte suggère que cet effet serait médié par les astrocytes.

Au vu de ce résultat, on pourrait se demander si l'effet du mGluR5 sur la LTP dépend de la libération de purines astrocytaires. En effet, les RA_{2A} pourraient être impliqués dans la LTP notamment en participant à la mobilisation des RAMPs (Dias et al., 2012). Cependant, le rôle du RA_{2A} dans l'induction de la LTP semble complexe. Par exemple, sa surexpression dans le CA3 est délétère pour la LTP (Viana da Silva et al., 2016). En outre, le type de LTP en question est dépendant du RNMDA (Lu et al., 1997) et le blocage du mGluR5 affecte la potentialisation des RNMDA (Mannaioni et al., 2001) ce qui suggère un effet spécifiquement postsynaptique. Or, la boucle de régulation que nous avons mise en évidence semble affecter spécifiquement le locus présynaptique. Rien n'indique donc que cette voie serait impliquée dans l'induction de la LTP. En revanche, l'astrocyte étant bien connu pour son implication dans la LTP via la libération de D-sérine (Henneberger et al., 2010; Panatier et al., 2006), j'ai décidé de tester si le déficit de LTP pouvait être lié à une altération de la libération de D-sérine par les astrocytes.

Pour cela, j'ai ajouté de la D-sérine dans l'ACSF avant d'induire la LTP. L'apport de D-sérine exogène chez les animaux exprimant le peptide mGluR5 dominant négatif a permis de compenser le déficit de LTP. Ce résultat suggère que le mGluR5 astrocytaire serait en effet impliqué dans la libération de D-serine. Il faudrait toutefois réaliser des expériences complémentaires pour confirmer ce résultat. Par exemple, il faudrait tester le niveau d'occupation du site glycine des RNMDA. Pour cela, on peut bloquer les récepteurs AMPA afin d'enregistrer la signalisation NMDA de manière isolée et ajouter une concentration saturante de D-sérine (Panatier et al., 2006). L'augmentation de l'activité NMDA en réponse à la D-serine devrait alors être inversement proportionnelle au taux de D-serine initialement disponible dans l'espace extracellulaire. Si le mGluR5 astrocytaire est bien impliqué dans la libération de D-sérine, on peut s'attendre à ce que le niveau d'occupation du site glycine des RNMDA soit plus faible chez les animaux dont les astrocytes expriment le peptide mGluR5Dn

Etude n°2 : Pregnenolone rescued hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory impairments in Ts65Dn Down syndrome mouse model

Résumé des résultats

Les expériences ayant mis en évidence un déficit de la production de prégnénolone chez les souris Ts65Dn ainsi que les tests comportementaux démontrant les troubles de la mémoire de ces souris ont été réalisés par nos collaborateurs. La discussion sera principalement axée sur les résultats des expériences d'électrophysiologie que j'ai réalisées et qui ont montré que les souris Ts65Dn présentent un déficit de LTP qui est compensé par un apport en prégnénolone.

Les souris Ts65Dn présentent un déficit de LTP

Un déficit de LTP sur le modèle Ts65Dn a déjà été observé dans la littérature (Costa & Grybko, 2005; Schulz et al., 2019; Siarey et al., 1997). Le résultat que nous avons obtenu est donc cohérent avec ces études.

De manière intéressante, il a été montré que le déficit de LTP chez les souris Ts65Dn pouvait être visible ou non en fonction du protocole d'induction utilisé. En effet, l'étude de Costa & Grybko (2005) montre que les Ts65Dn présentent un déficit de LTP lorsque celle-ci est induite avec un protocole de burst de rythme thêta (TBS). En revanche, un protocole de stimulation tétanique a induit une LTP similaire au groupe contrôle. Ce résultat peut s'expliquer par la nature des protocoles d'induction. La stimulation tétanique consiste en un train de stimulations à haute fréquence (100Hz) pendant une seconde, pouvant être répété 1 à 4 fois. Il s'agit du premier protocole d'induction mis au point et c'est encore aujourd'hui l'un des plus utilisés. Ce protocole simple est très efficace pour induire la LTP. Cependant, il est parfois critiqué car il est considéré comme artificiel étant donné qu'il n'a pas de corrélat physiologique. Une alternative est le protocole de TBS. Ce protocole est constitué de 10 trains de 4 stimulations à 100Hz avec un intervalle de 200ms entre chaque train. Il est réputé plus physiologique car il reproduit les patterns d'activation des neurones *in vivo*. De plus, la fréquence de répétition des trains (5Hz) est calée sur les oscillations thêta qui sont le rythme cérébral détecté dans l'hippocampe lors de l'activité (Larson & Munkácsy, 2015). Ainsi, il est possible qu'une dérégulation de la transmission synaptique impacte la LTP induite par une stimulation proche de celle physiologique mais qu'une stimulation plus intense soit capable de générer une LTP malgré le déficit. Cela pourrait indiquer que les mécanismes nécessaires à l'induction d'une potentialisation à long terme sont toujours présents chez les Ts65Dn mais que le seuil d'induction est modifié et n'est plus pertinent dans un contexte physiologique. Cela semble cohérent avec le fait que l'inhibition médiée par les neurones GABAergiques au niveau des dendrites serait trop prononcée dans l'hippocampe SD (Schulz et al., 2019). Pour ces raisons, j'ai choisi d'utiliser un protocole d'induction TBS pour ces expériences.

La prégnénolone restaure la LTP

La prégnénolone est un précurseur des hormones stéroïdiennes, tout comme la corticostérone. Il a déjà été montré que la prégnénolone pouvait agir comme modulateur allostérique négatif des récepteurs CB1 (Vallée, 2016). Cependant, lorsqu'elle est appliquée de manière répétée en sous-cutanée comme lors des tests comportementaux on ne peut exclure un effet dû à l'un de ses dérivés. Le fait que la prégnénolone soit efficace lors de son application aiguë sur tranche va dans le sens d'un effet direct sur la signalisation et non d'une modulation hormonale sur le long terme. Cependant, pour s'assurer que ses métabolites n'ont pas d'effet, il faudrait tester un dérivé non métabolisable ou l'administrer conjointement avec un inhibiteur de l'enzyme 3 beta-hydroxystéroïde déhydrogénase-isomérase nécessaire à sa métabolisation (Cooke, 1996).

Rôle des astrocytes

Notre étude souligne l'impact de la dérégulation du système endocannabinoïde sur la plasticité synaptique à long terme dans le SD. Ces résultats sont en accord avec des études récentes (Navarro-Romero et al., 2019) et placent les récepteurs CB1 et la prégnénolone comme des cibles thérapeutiques potentielles. Nous n'avons pas testé l'implication des astrocytes dans les déficits de plasticité observés. Pourtant, le fonctionnement des astrocytes est altéré dans le SD (Mizuno et al., 2018) et, comme nous l'avons vu dans la première étude, ils jouent un rôle important dans l'induction de la LTP. Il serait intéressant d'évaluer leur implication dans ces déficits.

Il se trouve que les astrocytes expriment les récepteurs CB1 et qu'ils sont activés par les endocannabinoïdes neuronaux (Metna-Laurent & Marsicano, 2015; Navarrete et al., 2014). L'activation des CB1 astrocytaires induit une réponse calcique et peut participer à certaines formes de LTP via la libération de glutamate astrocytaire (Gómez-Gonzalo et al., 2015). De plus, dans la région CA1 de l'hippocampe, l'astrocyte est connu pour libérer le co-agoniste endogène des récepteurs postsynaptiques de type NMDA (Henneberger et al., 2010). Cette libération dépend de la présence des récepteurs CB1 astrocytaires (Robin et al., 2018). En effet, des travaux récents réalisés dans l'équipe en collaboration avec l'équipe de Giovanni Marsicano montrent que chez des souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur CB1 dans les astrocytes la disponibilité en D-sérine dans la fente synaptique est diminuée et dès lors, le taux d'occupation du site glycine, la LTP et la mémoire sont altérées (Robin et al., 2018). La D-sérine est produite à partir du 3-phosphoglycérate issu de la glycolyse (Le Douce et al., 2020) et une étude récente à laquelle j'ai participé montre que les CB1 astrocytaires présents au niveau de la mitochondrie jouent un rôle clé dans la production du lactate et la transmission neuronale via une modulation directe du métabolisme du glucose (Jimenez-Blasco et al., 2020). On peut émettre l'hypothèse que dans le contexte du SD, l'astrocyte serait également impliqué

dans le déficit de plasticité synaptique à long terme via une dérégulation des récepteurs CB1 mitochondriaux.

Une première expérience simple pour explorer cette hypothèse serait d'apporter de la D-sérine exogène lors de l'induction de la LTP. Si, comme la prégnénolone, la D-sérine est capable de rétablir la LTP chez les Ts65Dn, cela pourrait confirmer une interaction entre la production de D-sérine et la signalisation endocannabinoïde dans le cadre du SD. Cela suggérerait également un rôle des astrocytes dans ce déficit.

Cependant, les études présentées ci-dessus montrent que le blocage des CB1, tout comme leur hyperactivation, est néfaste pour la LTP (Navarro-Romero et al., 2019; Robin et al., 2018). Cela souligne que la communication entre les astrocytes et les neurones doit être finement adaptée pour être efficace. Il semblerait que dans le cas du SD, l'activité astrocytaire soit dérégulée de manière globale et que la communication ne soit plus pertinente. D'autres aspects de la gliotransmission sont affectés, comme la libération de purines qui inhibe la transmission via les récepteurs A1 (Mizuno et al., 2018). Il pourrait être intéressant dans une autre étude de tester le rôle des purines astrocytaires dans les déficits du SD. De plus, étant donné que l'activité calcique est anormalement intense et que les mGluR5 astrocytaires sont surexprimés (Iyer et al., 2014), il serait pertinent de tester si l'application du peptide mGluR5 dominant négatif astrocytaire peut avoir un effet bénéfique en compensant la sur-activation de la cellule.

Conclusion

Lors de ma thèse j'ai étudié la régulation de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique en conditions physiologiques et pathologiques. Mon sujet principal a été l'étude de la régulation de la transmission par les purines astrocytaires. Cette première étude m'a permis de mettre en évidence que l'astrocyte exprime le mGluR5 chez le rat adulte et que ce récepteur lui permet de détecter et réguler la transmission synaptique de base via la libération de purines agissant sur les RA2A présynaptiques. De plus, ces travaux montrent que cette régulation est dépendante du niveau d'activité neuronale car elle n'est plus visible lorsque le nombre de fibres présynaptiques activées augmente. Cela suggère que l'astrocyte intègre l'information à l'échelle de son domaine et que sa régulation de la transmission dépend du niveau d'activité du réseau. Il serait nécessaire de réaliser une étude plus poussée notamment en combinant l'électrophysiologie à de l'imagerie calcique afin de déterminer comment l'astrocyte intègre l'information. Ce résultat est néanmoins très intéressant car le possible rôle de l'astrocyte comme intégrateur de l'information neuronale est encore peu exploré. Il se pourrait que le domaine ou le syncytium astrocytaire soit une unité de base de la coordination de

l'activité synaptique du réseau. D'ailleurs l'activité des astrocyte permettrait la synchronisation de l'activité neuronale (Angulo et al., 2004) et elle est importante pour la régulation des rythmes cérébraux (Foley et al., 2017).

En outre j'ai aussi montré que le mGluR5 astrocytaire jouait un rôle important dans la détection et la régulation de la plasticité synaptique à long terme, probablement en contrôlant la disponibilité en D-sérine. La LTP étant considérée comme le corrélât cellulaire de fonctions mnésiques telles que la mémoire, l'étude de l'importance du mGluR5 astrocytaire pour la cognition est donc une perspective intéressante. Par exemple la réalisation d'études comportementales sur des animaux ayant reçu le peptide bloquant le mGluR5 permettra d'évaluer le rôle de ce récepteur dans la mémoire. Etant donné que le peptide a un effet négatif sur la LTP on peut s'attendre à ce qu'il cause un déficit de mémoire. D'ailleurs une étude récente a montré que l'activation de l'astrocyte par optogénétique module la transmission synaptique et la plasticité à court terme via la libération de purine agissant sur les RA2A et favorise la LTP, possiblement via la libération de D-sérine (Mederos et al., 2019). Or cette manipulation aurait un effet bénéfique sur la mémoire des animaux (Adamsky et al., 2018; Mederos et al., 2019).

Pour conclure, les résultats que j'ai obtenus suggèrent un rôle important du mGluR5 astrocytaire pour une régulation fine de l'activité neuronale afin qu'elle reste pertinente pour la cognition à l'échelle du réseau. Or il est fréquent que l'expression du mGluR5 et l'activité calcique astrocytaire soient perturbés en conditions pathologiques (Sofroniew & Vinters, 2010).

Dans une seconde étude j'ai évalué la plasticité synaptique dans une de ces conditions pathologiques : le syndrome de Down (SD). Les souris modèles du SD présentent un déficit de LTP corrélé à une altération de la mémoire comparable à celle des patients SD. Une dérégulation du système endocannabinoïdes pourrait en être la cause. En effet le récepteur CB1 est surexprimé est la prégnénolone qui joue le rôle de modulateur allostérique négatif naturel de ce récepteur est, elle, moins présente. J'ai montré que qu'un apport exogène en prégnénolone pouvait rétablir une LTP normale chez les souris DS et ce résultat est corrélé avec une amélioration de la mémoire de ces animaux. La prégnénolone et le CB1 représentent des cibles thérapeutiques intéressantes, d'autant plus qu'il n'existe pas de traitement des symptômes cognitif du SD actuellement.

Cependant, du fait de l'altération de l'expression de très nombreux gènes, les déficits observés dans le SD ont probablement de multiples causes. Or dans cette pathologie, l'activité calcique astrocytaire et l'expression des mglur5 sont dérégulés (Iyer et al., 2014; Mizuno et al., 2018). Il n'est pas exclu que le mGluR5 astrocytaire soit impliqué dans les déficits de plasticité et de mémoire que

l'on retrouve dans le SD et il serait intéressant d'étudier plus en détail le rôle du mGluR5 astrocytaire dans le SD à l'avenir.

Bibliographie

- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groysman, M., et al. (2018). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell* 174, 59-71.e14.
- Agarwal, A., Wu, P.-H., Hughes, E.G., Fukaya, M., Tischfield, M.A., Langseth, A.J., Wirtz, D., and Bergles, D.E. (2017). Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes. *Neuron* 93, 587-605.e7.
- Agulhon, C., Petravic, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2008). What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59, 932-946.
- Agulhon, C., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2010). Hippocampal Short- and Long-Term Plasticity Are Not Modulated by Astrocyte Ca²⁺ Signaling. *Science* 327, 1250-1254.
- Akeson, E.C., Lambert, J.P., Narayanswami, S., Gardiner, K., Bechtel, L.J., and Davisson, M.T. (2001). Ts65Dn -- localization of the translocation breakpoint and trisomic gene content in a mouse model for Down syndrome. *Cytogenet. Cell Genet.* 93, 270-276.
- Akopian, G., and Walsh, J.P. (2002). Corticostriatal paired-pulse potentiation produced by voltage-dependent activation of NMDA receptors and L-type Ca(2+) channels. *J. Neurophysiol.* 87, 157-165.
- Allaman, I., Lengacher, S., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2003). A2B receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C696-704.
- Allen, E.G., Freeman, S.B., Druschel, C., Hobbs, C.A., O'Leary, L.A., Romitti, P.A., Royle, M.H., Torfs, C.P., and Sherman, S.L. (2009). Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum. Genet.* 125, 41-52.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., and O'Keefe, J. (2006). *The Hippocampus Book* (Oxford University Press).
- Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* 565, 23-29.
- Aoki, C., Venkatesan, C., Go, C.G., Mong, J.A., and Dawson, T.M. (1994). Cellular and subcellular localization of NMDA-R1 subunit immunoreactivity in the visual cortex of adult and neonatal rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 5202-5222.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208-215.
- Araque, A., Martín, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., and Buño, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 2443-2450.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728-739.
- Arizono, M., Bannai, H., Nakamura, K., Niwa, F., Enomoto, M., Matsu-ura, T., Miyamoto, A., Sherwood, M.W., Nakamura, T., and Mikoshiba, K. (2012). Receptor-Selective Diffusion Barrier

Enhances Sensitivity of Astrocytic Processes to Metabotropic Glutamate Receptor Stimulation. *Sci. Signal.* **5**, ra27–ra27.

Arizono, M., Inavalli, V.V.G.K., Panatier, A., Pfeiffer, T., Angibaud, J., Levet, F., Ter Veer, M.J.T., Stobart, J., Bellocchio, L., Mikoshiba, K., et al. (2020). Structural basis of astrocytic Ca²⁺ signals at tripartite synapses. *Nat. Commun.* **11**, 1906.

Attwell, D., and Laughlin, S.B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 1133–1145.

Ayala, J.E., Chen, Y., Banko, J.L., Sheffler, D.J., Williams, R., Telk, A.N., Watson, N.L., Xiang, Z., Zhang, Y., Jones, P.J., et al. (2009). mGluR5 positive allosteric modulators facilitate both hippocampal LTP and LTD and enhance spatial learning. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **34**, 2057–2071.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* **513**, 532–541.

Balázs, R., Miller, S., Romano, C., Vries, A.D., Chun, Y., and Cotman, C.W. (1997). Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 in Astrocytes: Pharmacological Properties and Agonist Regulation. *J. Neurochem.* **69**, 151–163.

Baltaci, S.B., Mogulkoc, R., and Baltaci, A.K. (2019). Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem. Res.* **44**, 281–296.

Basu, A.C., Tsai, G.E., Ma, C.-L., Ehmsen, J.T., Mustafa, A.K., Han, L., Jiang, Z.I., Benneyworth, M.A., Froimowitz, M.P., Lange, N., et al. (2009). Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Mol. Psychiatry* **14**, 719–727.

Battaglia, F., Quartarone, A., Rizzo, V., Ghilardi, M.F., Di Rocco, A., Tortorella, G., and Girlanda, P. (2008). Early impairment of synaptic plasticity in patients with Down's syndrome. *Neurobiol. Aging* **29**, 1272–1275.

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

Becker, L., Mito, T., Takashima, S., and Onodera, K. (1991). Growth and development of the brain in Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* **373**, 133–152.

Becker, L.E., Armstrong, D.L., and Chan, F. (1986). Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **20**, 520–526.

Bender, E., Buist, A., Jurzak, M., Langlois, X., Baggerman, G., Verhasselt, P., Ercken, M., Guo, H.-Q., Wintmolders, C., Van den Wyngaert, I., et al. (2002). Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8573–8578.

Benediktsson, A.M., Marrs, G.S., Tu, J.C., Worley, P.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., and Dailey, M.E. (2012). Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia* **60**, 175–188.

- Bennett, M.R., Buljan, V., Farnell, L., and Gibson, W.G. (2006). Purinergic junctional transmission and propagation of calcium waves in spinal cord astrocyte networks. *Biophys. J.* *91*, 3560–3571.
- Bennett, M.V., Aljure, E., Nakajima, Y., and Pappas, G.D. (1963). Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science* *141*, 262–264.
- Bergersen, L.H., Morland, C., Ormel, L., Rinholm, J.E., Larsson, M., Wold, J.F.H., Røe, A.T., Stranna, A., Santello, M., Bouvier, D., et al. (2012). Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *22*, 1690–1697.
- Bergles, D.E., Jabs, R., and Steinhäuser, C. (2010). Neuron-glia synapses in the brain. *Brain Res. Rev.* *63*, 130–137.
- Berk, A.T., Saatci, A.O., Erçal, M.D., Tunç, M., and Ergin, M. (1996). Ocular findings in 55 patients with Down's syndrome. *Ophthalmic Genet.* *17*, 15–19.
- Bernstein, M., Behnisch, T., Balschun, D., Reymann, K.G., and Reiser, G. (1998). Pharmacological characterisation of metabotropic glutamatergic and purinergic receptors linked to Ca²⁺ signalling in hippocampal astrocytes. *Neuropharmacology* *37*, 169–178.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., and Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* *391*, 281–285.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., and Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* *7*, 613–620.
- Biber, K., Klotz, K.N., Berger, M., Gebicke-Härter, P.J., and van Calcar, D. (1997). Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 4956–4964.
- Bindocci, E., Savtchouk, I., Liaudet, N., Becker, D., Carriero, G., and Volterra, A. (2017). Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science* *356*.
- Björklund, O., Shang, M., Tonazzini, I., Daré, E., and Fredholm, B.B. (2008). Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. *Eur. J. Pharmacol.* *596*, 6–13.
- Bliss, T.V., and Lomo, 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.
- Bloodgood, B.L., and Sabatini, B.L. (2007). Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 345–351.
- Boehm, J., Kang, M.-G., Johnson, R.C., Esteban, J., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2006). Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* *51*, 213–225.
- Boison, D., Chen, J.-F., and Fredholm, B.B. (2010). Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ.* *17*, 1071–1082.
- Bootman, M.D., Lipp, P., and Berridge, M.J. (2001). The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J. Cell Sci.* *114*, 2213–2222.

- Borea, P.A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., and Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol. Rev.* 98, 1591–1625.
- Bormann, J., and Kettenmann, H. (1988). Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9336–9340.
- Bottai, D., Guzowski, J.F., Schwarz, M.K., Kang, S.H., Xiao, B., Lanahan, A., Worley, P.F., and Seeburg, P.H. (2002). Synaptic activity-induced conversion of intronic to exonic sequence in Homer 1 immediate early gene expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 167–175.
- Bowman, C.L., and Kimelberg, H.K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature* 311, 656–659.
- Bowser, D.N., and Khakh, B.S. (2007). Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J. Gen. Physiol.* 129, 485–491.
- Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Huganir, R.L., and Worley, P.F. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284–288.
- Brenowitz, S., and Trussell, L.O. (2001). Minimizing synaptic depression by control of release probability. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 1857–1867.
- Briggs, J.A., Sun, J., Shepherd, J., Ovchinnikov, D.A., Chung, T.-L., Nayler, S.P., Kao, L.-P., Morrow, C.A., Thakar, N.Y., Soo, S.-Y., et al. (2013). Integration-free induced pluripotent stem cells model genetic and neural developmental features of down syndrome etiology. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 467–478.
- Burnstock, G. (1975). Comparative studies of purinergic nerves. *J. Exp. Zool.* 194, 103–133.
- Burnstock, G., and Verkhratsky, A. (2012). Purinergic Signalling and the Nervous System.
- Buscemi, L., Ginet, V., Lopatar, J., Montana, V., Pucci, L., Spagnuolo, P., Zehnder, T., Grubišić, V., Truttman, A., Sala, C., et al. (2017). Homer1 Scaffold Proteins Govern Ca²⁺ Dynamics in Normal and Reactive Astrocytes. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 27, 2365–2384.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., and Ellisman, M.H. (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 73–86.
- Busquets-Garcia, A., Desprez, T., Metna-Laurent, M., Bellocchio, L., Marsicano, G., and Soria-Gomez, E. (2015). Dissecting the cannabinergic control of behavior: The where matters. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 37, 1215–1225.
- Busquets-Garcia, A., Soria-Gómez, E., Redon, B., Mackenbach, Y., Vallée, M., Chaoulloff, F., Varilh, M., Ferreira, G., Piazza, P.-V., and Marsicano, G. (2017). Pregnenolone blocks cannabinoid-induced acute psychotic-like states in mice. *Mol. Psychiatry* 22, 1594–1603.
- Cabello, N., Gandía, J., Bertarelli, D.C.G., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Luján, R., and Ciruela, F. (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J. Neurochem.* 109, 1497–1507.

- Cai, Z., and Kimelberg, H.K. (1997). Glutamate receptor-mediated calcium responses in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Glia* 21, 380–389.
- Cai, Z., Schools, G.P., and Kimelberg, H.K. (2000). Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. *Glia* 29, 70–80.
- Camici, M., Garcia-Gil, M., and Tozzi, M.G. (2018). The Inside Story of Adenosine. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 784.
- Canals, M., Burgueño, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L., Ferré, S., Bouvier, M., Fuxe, K., et al. (2004). Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* 88, 726–734.
- Cao, Z., Hulsizer, S., Cui, Y., Pretto, D.L., Kim, K.H., Hagerman, P.J., Tassone, F., and Pessah, I.N. (2013). Enhanced asynchronous Ca(2+) oscillations associated with impaired glutamate transport in cortical astrocytes expressing Fmr1 gene premutation expansion. *J. Biol. Chem.* 288, 13831–13841.
- Casabona, G., Knöpfel, T., Kuhn, R., Gasparini, F., Baumann, P., Sortino, M.A., Copani, A., and Nicoletti, F. (1997). Expression and coupling to polyphosphoinositide hydrolysis of group I metabotropic glutamate receptors in early postnatal and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 9, 12–17.
- Catterall, W.A., and Few, A.P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59, 882–901.
- Cellai, L., Carvalho, K., Faivre, E., Deleau, A., Vieau, D., Buée, L., Blum, D., Mériaux, C., and Gomez-Murcia, V. (2018). The Adenosinergic Signaling: A Complex but Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 12, 520.
- Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., and Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15, 711–720.
- Chen, C., Jiang, P., Xue, H., Peterson, S.E., Tran, H.T., McCann, A.E., Parast, M.M., Li, S., Pleasure, D.E., Laurent, L.C., et al. (2014). Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 5, 4430.
- Chen, J., Tan, Z., Zeng, L., Zhang, X., He, Y., Gao, W., Wu, X., Li, Y., Bu, B., Wang, W., et al. (2013). Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes. *Glia* 61, 178–191.
- Chen, N., Sugihara, H., Sharma, J., Perea, G., Petravic, J., Le, C., and Sur, M. (2012). Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2832–2841.
- Childs, E., and de Wit, H. (2006). Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. *Psychopharmacology (Berl.)* 185, 514–523.
- Chipman, P.H., Fung, C.C.A., Pazo Fernandez, A., Sawant, A., Tedoldi, A., Kawai, A., Ghimire Gautam, S., Kurosawa, M., Abe, M., Sakimura, K., et al. (2021). Astrocyte GluN2C NMDA receptors control basal synaptic strengths of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the stratum radiatum. *ELife* 10, e70818.

- Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E.A., and Buzsáki, G. (2010). Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 15298–15303.
- Ciccarelli, R., Ballerini, P., Sabatino, G., Rathbone, M.P., D’Onofrio, M., Caciagli, F., and Di Iorio, P. (2001). Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* *19*, 395–414.
- Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M.M., Canela, E.I., Mallol, J., Chan, W.Y., Lluís, C., et al. (2001). Metabotropic glutamate 1 α and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 18345–18351.
- Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Cunha, R.A., Lluís, C., and Franco, R. (2006). Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 2427–2431.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *33*, 18–41.
- Clark, K.A., Randall, A.D., and Collingridge, G.L. (1994). A comparison of paired-pulsed facilitation of AMPA and NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents in the hippocampus. *Exp. Brain Res.* *101*, 272–278.
- Clément, T., Lee, J.B., Ichkova, A., Rodriguez-Grande, B., Fournier, M.-L., Aussudre, J., Ogier, M., Haddad, E., Canini, F., Koehl, M., et al. (2020). Juvenile mild traumatic brain injury elicits distinct spatiotemporal astrocyte responses. *Glia* *68*, 528–542.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., and McLennan, H. (1983). The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J. Physiol.* *334*, 19–31.
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2007). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus* *17*, 665–678.
- Cooke, G.M. (1996). Differential effects of trilostane and cyanoketone on the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase reactions in androgen and 16-androstene biosynthetic pathways in the pig testis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *58*, 95–101.
- Coppi, E., Cellai, L., Maraula, G., Pugliese, A.M., and Pedata, F. (2013). Adenosine A_{2A} receptors inhibit delayed rectifier potassium currents and cell differentiation in primary purified oligodendrocyte cultures. *Neuropharmacology* *73*, 301–310.
- Cornell-Bell, A.H., Thomas, P.G., and Smith, S.J. (1990a). The excitatory neurotransmitter glutamate causes filopodia formation in cultured hippocampal astrocytes. *Glia* *3*, 322–334.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990b). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* *247*, 470–473.
- Costa, A.C.S., and Grybko, M.J. (2005). Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: A model of Down syndrome. *Neurosci. Lett.* *382*, 317–322.

Costenla, A.R., Diógenes, M.J., Canas, P.M., Rodrigues, R.J., Nogueira, C., Maroco, J., Agostinho, P.M., Ribeiro, J.A., Cunha, R.A., and de Mendonça, A. (2011). Enhanced role of adenosine A(2A) receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing. *Eur. J. Neurosci.* *34*, 12–21.

Cramer, N., and Galdzicki, Z. (2012). From abnormal hippocampal synaptic plasticity in down syndrome mouse models to cognitive disability in down syndrome. *Neural Plast.* *2012*, 101542.

Crowe, S.E., Kantevari, S., and Ellis-Davies, G.C.R. (2010). Photochemically initiated intracellular astrocytic calcium waves in living mice using two-photon uncaging of IP(3). *ACS Chem. Neurosci.* *1*, 575–585.

Csölle, C., Heinrich, A., Kittel, A., and Sperlágh, B. (2008). P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. *J. Neurochem.* *106*, 347–360.

Dale, N., and Frenguelli, B.G. (2009). Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy. *Curr. Neuropharmacol.* *7*, 160–179.

Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* *65*, 1–105.

Daré, E., Schulte, G., Karovic, O., Hammarberg, C., and Fredholm, B.B. (2007). Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol. Behav.* *92*, 15–20.

D’Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D.F., Auberson, Y.P., Moss, S.J., and Haydon, P.G. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1995–2000.

Davisson, M.T., Schmidt, C., Reeves, R.H., Irving, N.G., Akeson, E.C., Harris, B.S., and Bronson, R.T. (1993). Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* *384*, 117–133.

Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., and Volterra, A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* *14*, 1276–1284.

Di Maio, V. (2021). The glutamatergic synapse: a complex machinery for information processing. *Cogn. Neurodyn.* *15*, 757–781.

Dias, R.B., Ribeiro, J.A., and Sebastião, A.M. (2012). Enhancement of AMPA currents and GluR1 membrane expression through PKA-coupled adenosine A2A receptors. *Hippocampus* *22*, 276–291.

Dierssen, M. (2012). Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 844–858.

Ding, S. (2013). In vivo astrocytic Ca²⁺ signaling in health and brain disorders. *Future Neurol.* *8*, 529–554.

Diógenes, M.J., Fernandes, C.C., Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (2004). Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 2905–2913.

Dixon, A.K., Gubit, A.K., Sirinathsinghji, D.J., Richardson, P.J., and Freeman, T.C. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 1461–1468.

Djukic, B., Casper, K.B., Philpot, B.D., Chin, L.-S., and McCarthy, K.D. (2007). Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 11354–11365.

Dobrunz, L.E. (2002). Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 20, 225–236.

Dobrunz, L.E., and Stevens, C.F. (1997). Heterogeneity of Release Probability, Facilitation, and Depletion at Central Synapses. *Neuron* 18, 995–1008.

Doengi, M., Deitmer, J.W., and Lohr, C. (2008). New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 2368–2378.

Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022.

Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., and Geczy, C.L. (2013). Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 24–57.

Donlea, J.M., Alam, M.N., and Szymusiak, R. (2017). Neuronal substrates of sleep homeostasis; lessons from flies, rats and mice. *Curr. Opin. Neurobiol.* 44, 228–235.

Dou, Y., Wu, H., Li, H., Qin, S., Wang, Y., Li, J., Lou, H., Chen, Z., Li, X., Luo, Q., et al. (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res.* 22, 1022–1033.

Durand, D., Carniglia, L., Caruso, C., and Lasaga, M. (2013). mGlu3 receptor and astrocytes: partners in neuroprotection. *Neuropharmacology* 66, 1–11.

Dziedzic, B., Prevot, V., Lomniczi, A., Jung, H., Cornea, A., and Ojeda, S.R. (2003). Neuron-to-Glia Signaling Mediated by Excitatory Amino Acid Receptors Regulates ErbB Receptor Function in Astroglial Cells of the Neuroendocrine Brain. *J. Neurosci.* 23, 915–926.

Egan, T.M., and Khakh, B.S. (2004). Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 3413–3420.

Egawa, K., Yamada, J., Furukawa, T., Yanagawa, Y., and Fukuda, A. (2013). Cl⁻ homeodynamics in gap junction-coupled astrocytic networks on activation of GABAergic synapses. *J. Physiol.* 591, 3901–3917.

Ehrengruber, M.U., Kato, A., Inokuchi, K., and Hennou, S. (2004). Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. *Mol. Neurobiol.* 29, 213–227.

Eichenbaum, H. (2017). Prefrontal-hippocampal interactions in episodic memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 547–558.

Engel, T., Gomez-Villafuertes, R., Tanaka, K., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Garcia-Huerta, P., Miras-Portugal, M.T., Henshall, D.C., and Diaz-Hernandez, M. (2012). Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 1616–1628.

- Esteban, J.A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* *6*, 136–143.
- Fan, D., Grooms, S.Y., Araneda, R.C., Johnson, A.B., Dobrenis, K., Kessler, J.A., and Zukin, R.S. (1999). AMPA receptor protein expression and function in astrocytes cultured from hippocampus. *J. Neurosci. Res.* *57*, 557–571.
- Felmy, F., Neher, E., and Schneggenburger, R. (2003). The timing of phasic transmitter release is Ca²⁺-dependent and lacks a direct influence of presynaptic membrane potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15200–15205.
- Feng, H., Moakley, D.F., Chen, S., McKenzie, M.G., Menon, V., and Zhang, C. (2021). Complexity and graded regulation of neuronal cell-type-specific alternative splicing revealed by single-cell RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *118*, e2013056118.
- Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2004). Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 722–732.
- Fields, R.D. (2011). Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 214–219.
- Fischer, T., Prey, J., Eschholz, L., Rotermund, N., and Lohr, C. (2021). Norepinephrine-Induced Calcium Signaling and Store-Operated Calcium Entry in Olfactory Bulb Astrocytes. *Front. Cell. Neurosci.* *15*, 639754.
- Franke, H., Grosche, J., Schädlich, H., Krügel, U., Allgaier, C., and Illes, P. (2001). P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* *108*, 421–429.
- Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G., and Illes, P. (2012). Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal.* *8*, 629–657.
- Fredholm, B.B. (1995). Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol. Toxicol.* *76*, 93–101.
- Fredholm, B.B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., and Zvartau, E.E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* *51*, 83–133.
- Fredholm, B.B., Chen, J.-F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J.-M. (2005). Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* *63*, 191–270.
- Furshpan, E.J., and Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* *145*, 289–325.
- Gandhi, R., Luk, K.C., Ryman, V.V., and Sadikot, A.F. (2008). Group I mGluR5 metabotropic glutamate receptors regulate proliferation of neuronal progenitors in specific forebrain developmental domains. *J. Neurochem.* *104*, 155–172.
- Garcia-Gil, M., Camici, M., Allegrini, S., Pesì, R., and Tozzi, M.G. (2021). Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. *Front. Pharmacol.* *12*, 672182.

George, J., Cunha, R.A., Mulle, C., and Amédée, T. (2016). Microglia-derived purines modulate mossy fibre synaptic transmission and plasticity through P2X4 and A1 receptors. *Eur. J. Neurosci.* *43*, 1366–1378.

Gerevich, Z., Borvendeg, S.J., Schröder, W., Franke, H., Wirkner, K., Nörenberg, W., Fürst, S., Gillen, C., and Illes, P. (2004). Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 797–807.

Gerstein, H., O’Riordan, K., Osting, S., Schwarz, M., and Burger, C. (2012). Rescue of synaptic plasticity and spatial learning deficits in the hippocampus of Homer1 knockout mice by recombinant Adeno-associated viral gene delivery of Homer1c. *Neurobiol. Learn. Mem.* *97*, 17–29.

Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M., et al. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8606–8611.

Glaum, S.R., Holzwarth, J.A., and Miller, R.J. (1990). Glutamate receptors activate Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ influx into astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 3454–3458.

Godfrey, M., and Lee, N.R. (2018). Memory profiles in Down syndrome across development: a review of memory abilities through the lifespan. *J. Neurodev. Disord.* *10*, 5.

Gómez-Gonzalo, M., Navarrete, M., Perea, G., Covelo, A., Martín-Fernández, M., Shigemoto, R., Luján, R., and Araque, A. (2015). Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *25*, 3699–3712.

Gorzalka, S., Vittori, S., Volpini, R., Cristalli, G., von Kügelgen, I., and Müller, C.E. (2005). Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* *67*, 955–964.

Griemsmann, S., Höft, S.P., Bedner, P., Zhang, J., von Staden, E., Beinhauer, A., Degen, J., Dublin, P., Cope, D.W., Richter, N., et al. (2015). Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *25*, 3420–3433.

Gubert, F., Zaverucha-do-Valle, C., Pimentel-Coelho, P.M., Mendez-Otero, R., and Santiago, M.F. (2009). Radial glia-like cells persist in the adult rat brain. *Brain Res.* *1258*, 43–52.

Gubitz, A.K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K.A., and Richardson, P.J. (1996). Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J. Neurochem.* *67*, 374–381.

Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtieri, F., Ciani, E., and Bartesaghi, R. (2008). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *18*, 180–197.

Guidolin, D., Marcoli, M., Tortorella, C., Maura, G., and Agnati, L.F. (2020). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor interaction in neurons and astrocytes: Evidence and perspectives. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *169*, 247–277.

- Gundlfinger, A., Bischofberger, J., Jochenning, F.W., Torvinen, M., Schmitz, D., and Breustedt, J. (2007). Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *J. Physiol.* 582, 263–277.
- Halassa, M.M., and Haydon, P.G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335–355.
- Ham, J., and Rees, D.A. (2008). The adenosine a2b receptor: its role in inflammation. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 8, 244–254.
- Hamby, M.E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D.H., Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 14489–14510.
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D.N., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., et al. (2012). Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell* 148, 1039–1050.
- Hansson, E., Simonsson, P., and Alling, C. (1987). 5-Hydroxytryptamine stimulates the formation of inositol phosphate in astrocytes from different regions of the brain. *Neuropharmacology* 26, 1377–1382.
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262–2267.
- Haydar, T.F., and Reeves, R.H. (2012). Trisomy 21 and early brain development. *Trends Neurosci.* 35, 81–91.
- Hazan, L., and Ziv, N.E. (2020). Activity Dependent and Independent Determinants of Synaptic Size Diversity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 40, 2828–2848.
- Hebb, D.O. *The Organization of Behavior : A Neuropsychological Theory.*
- Helmchen, F., Borst, J.G., and Sakmann, B. (1997). Calcium dynamics associated with a single action potential in a CNS presynaptic terminal. *Biophys. J.* 72, 1458–1471.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232–236.
- Henneberger, C., Bard, L., Panatier, A., Reynolds, J.P., Kopach, O., Medvedev, N.I., Minge, D., Herde, M.K., Anders, S., Kraev, I., et al. (2020). LTP Induction Boosts Glutamate Spillover by Driving Withdrawal of Perisynaptic Astroglia. *Neuron* 108, 919–936.e11.
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377–1391.
- Hermans, E., and Challiss, R.A. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 359, 465–484.

- Honsek, S.D., Walz, C., Kafitz, K.W., and Rose, C.R. (2012). Astrocyte calcium signals at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses correlate with the number of activated synapses but not with synaptic strength. *Hippocampus* 22, 29–42.
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., and Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5207–5217.
- Huo, H.-Q., Qu, Z.-Y., Yuan, F., Ma, L., Yao, L., Xu, M., Hu, Y., Ji, J., Bhattacharyya, A., Zhang, S.-C., et al. (2018). Modeling Down Syndrome with Patient iPSCs Reveals Cellular and Migration Deficits of GABAergic Neurons. *Stem Cell Rep.* 10, 1251–1266.
- Hyde, L.A., and Crnic, L.S. (2001). Age-related deficits in context discrimination learning in Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease. *Behav. Neurosci.* 115, 1239–1246.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C., and Scemes, E. (2009). Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels." *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 7092–7097.
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., and Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* 61, 1320–1330.
- Iwai, M., Tateishi, Y., Hattori, M., Mizutani, A., Nakamura, T., Futatsugi, A., Inoue, T., Furuichi, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005). Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *J. Biol. Chem.* 280, 10305–10317.
- Iyer, A.M., van Scheppingen, J., Milenkovic, I., Anink, J.J., Lim, D., Genazzani, A.A., Adle-Biassette, H., Kovacs, G.G., and Aronica, E. (2014). Metabotropic glutamate receptor 5 in Down's syndrome hippocampus during development: increased expression in astrocytes. *Curr. Alzheimer Res.* 11, 694–705.
- Jabs, R., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., and Steinhäuser, C. (1994). Kainate activates Ca(2+)-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K⁺ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflugers Arch.* 426, 310–319.
- Jabs, R., Matthias, K., Grote, A., Grauer, M., Seifert, G., and Steinhäuser, C. (2007). Lack of P2X receptor mediated currents in astrocytes and GluR type glial cells of the hippocampal CA1 region. *Glia* 55, 1648–1655.
- Jacola, L.M., Byars, A.W., Chalfonte-Evans, M., Schmithorst, V.J., Hickey, F., Patterson, B., Hotze, S., Vannest, J., Chiu, C.-Y., Holland, S.K., et al. (2011). Functional magnetic resonance imaging of cognitive processing in young adults with Down syndrome. *Am. J. Intellect. Dev. Disabil.* 116, 344–359.
- Jahr, C.E., and Stevens, C.F. (1993). Calcium permeability of the N-methyl-D-aspartate receptor channel in hippocampal neurons in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11573–11577.
- Jarvis, M.F., Burgard, E.C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T.J., Subieta, A., Van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., et al. (2002). A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 17179–17184.

- Jiménez, A.I., Castro, E., Mirabet, M., Franco, R., Delicado, E.G., and Miras-Portugal, M.T. (1999). Potentiation of ATP calcium responses by A2B receptor stimulation and other signals coupled to Gs proteins in type-1 cerebellar astrocytes. *Glia* 26, 119–128.
- Jimenez-Blasco, D., Busquets-Garcia, A., Hebert-Chatelain, E., Serrat, R., Vicente-Gutierrez, C., Ioannidou, C., Gómez-Sotres, P., Lopez-Fabuel, I., Resch-Beuscher, M., Resel, E., et al. (2020). Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. *Nature* 583, 603–608.
- Joint Research Centre (European Commission), Lanzoni, M., Martin, S., Kinsner-Ovaskainen, A., and Morris, J. (2019). EUROCAT: surveillance of congenital anomalies in Europe : epidemiology of Down syndrome, 1990 2014 (LU: Publications Office of the European Union).
- Jung, J., Shin, Y.H., Konishi, H., Lee, S.J., and Kiyama, H. (2013). Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 488–493.
- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., and Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23, 1–10.
- Kaesler, P.S., and Regehr, W.G. (2017). The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Curr. Opin. Neurobiol.* 43, 63–70.
- Kahlem, P., Sultan, M., Herwig, R., Steinfath, M., Balzereit, D., Eppens, B., Saran, N.G., Pletcher, M.T., South, S.T., Stetten, G., et al. (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome. *Genome Res.* 14, 1258–1267.
- Kanno, T., and Nishizaki, T. (2012). A(2a) adenosine receptor mediates PKA-dependent glutamate release from synaptic-like vesicles and Ca(2+) efflux from an IP(3)- and ryanodine-insensitive intracellular calcium store in astrocytes. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 30, 1398–1412.
- Kastritsis, C.H., Salm, A.K., and McCarthy, K. (1992). Stimulation of the P2Y purinergic receptor on type 1 astroglia results in inositol phosphate formation and calcium mobilization. *J. Neurochem.* 58, 1277–1284.
- Kato, A., Ozawa, F., Saitoh, Y., Fukazawa, Y., Sugiyama, H., and Inokuchi, K. (1998). Novel members of the Ves1/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 23969–23975.
- Katz, B., and Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 195, 481–492.
- Kawamura, M., Gachet, C., Inoue, K., and Kato, F. (2004). Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y1 receptors in the hippocampal slice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10835–10845.
- Kellner, V., Kersbergen, C.J., Li, S., Babola, T.A., Saher, G., and Bergles, D.E. (2021). Dual metabotropic glutamate receptor signaling enables coordination of astrocyte and neuron activity in developing sensory domains. *Neuron* 109, 2545–2555.e7.
- Kemp, J.A., Foster, A.C., Leeson, P.D., Priestley, T., Tridgett, R., Iversen, L.L., and Woodruff, G.N. (1988). 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6547–6550.

- Kettenmann, H., Backus, K.H., and Schachner, M. (1987). gamma-Aminobutyric acid opens Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Brain Res.* *404*, 1–9.
- Khakh, B.S., and Henderson, G. (1998). ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol. Pharmacol.* *54*, 372–378.
- Khakh, B.S., Gittermann, D., Cockayne, D.A., and Jones, A. (2003). ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 7426–7437.
- Khan, Z.U., Koulen, P., Rubinstein, M., Grandy, D.K., and Goldman-Rakic, P.S. (2001). An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1964–1969.
- Kierdorf, K., and Prinz, M. (2017). Microglia in steady state. *J. Clin. Invest.* *127*, 3201–3209.
- Kilpatrick, G.J., Dautzenberg, F.M., Martin, G.R., and Eglen, R.M. (1999). 7TM receptors: the splicing on the cake. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 294–301.
- Kim, C.S., and Johnston, D. (2015). A1 adenosine receptor-mediated GIRK channels contribute to the resting conductance of CA1 neurons in the dorsal hippocampus. *J. Neurophysiol.* *113*, 2511–2523.
- Kimelberg, H.K. (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *16*, 79–106.
- Kimelberg, H.K., Goderie, S.K., Higman, S., Pang, S., and Waniewski, R.A. (1990). Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *10*, 1583–1591.
- Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* *241*, 835–837.
- Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Villar, A.J., Epstein, C.J., Malenka, R.C., and Mobley, W.C. (2004). Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 8153–8160.
- Klishin, A., Lozovaya, N., and Krishtal, O. (1995). A1 adenosine receptors differentially regulate the N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated components of hippocampal excitatory postsynaptic current in a Ca²⁺/Mg²⁺-dependent manner. *Neuroscience* *65*, 947–953.
- Kniazeff, J., Bessis, A.-S., Maurel, D., Ansanay, H., Prézeau, L., and Pin, J.-P. (2004). Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 706–713.
- Kniazeff, J., Prézeau, L., Rondard, P., Pin, J.-P., and Goudet, C. (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol. Ther.* *130*, 9–25.
- Kobayashi, K., Takahashi, E., Miyagawa, Y., Yamanaka, H., and Noguchi, K. (2011). Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci. Lett.* *504*, 57–61.
- Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M.J., Chu, M., Kobilka, T.S., Laeremans, T., Steyaert, J., et al. (2019). Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* *566*, 79–84.

- Kofuji, P., and Newman, E.A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129, 1045–1056.
- Koizumi, S. (2010). Synchronization of Ca²⁺ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J.* 277, 286–292.
- Kola, B., Christ-Crain, M., Lolli, F., Arnaldi, G., Giacchetti, G., Boscaro, M., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2008). Changes in adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase as a mechanism of visceral obesity in Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4969–4973.
- Kong, T., Westerman, K.A., Faigle, M., Eltzschig, H.K., and Colgan, S.P. (2006). HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 2242–2250.
- Korn, H., Sotelo, C., and Crepel, F. (1973). Electronic coupling between neurons in the rat lateral vestibular nucleus. *Exp. Brain Res.* 16, 255–275.
- Krebs, C., Fernandes, H.B., Sheldon, C., Raymond, L.A., and Baimbridge, K.G. (2003). Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3364–3372.
- Kucheryavykh, Y.V., Kucheryavykh, L.Y., Nichols, C.G., Maldonado, H.M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S.N., and Eaton, M.J. (2007). Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia* 55, 274–281.
- Kukley, M., Barden, J.A., Steinhäuser, C., and Jabs, R. (2001). Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36, 11–21.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971–977.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R.A., and Verkhratsky, A. (2006). NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 2673–2683.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S.P., Rossner, M.J., North, R.A., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2008). P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5473–5480.
- Lalo, U., Palygin, O., Verkhratsky, A., Grant, S.G.N., and Pankratov, Y. (2016). ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Sci. Rep.* 6, 33609.
- Larson, J., and Munkácsy, E. (2015). Theta-burst LTP. *Brain Res.* 1621, 38–50.
- Larson, J., Wong, D., and Lynch, G. (1986). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 368, 347–350.
- Latini, S., and Pedata, F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79, 463–484.

- Latour, I., Gee, C.E., Robitaille, R., and 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.
- Lavialle, M., Aumann, G., Anlauf, E., Pröls, F., Arpin, M., and Derouiche, A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12915–12919.
- Lazarus, M., Chen, J.-F., Huang, Z.-L., Urade, Y., and Fredholm, B.B. (2019). Adenosine and Sleep. *Handb. Exp. Pharmacol.* *253*, 359–381.
- Le Douce, J., Maugard, M., Veran, J., Matos, M., Jégo, P., Vigneron, P.-A., Faivre, E., Toussay, X., Vandenberghe, M., Balbastre, Y., et al. (2020). Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab.* *31*, 503-517.e8.
- Leach, K., and Gregory, K.J. (2017). Molecular insights into allosteric modulation of Class C G protein-coupled receptors. *Pharmacol. Res.* *116*, 105–118.
- Lee, C., and Chern, Y. (2014). Adenosine receptors and Huntington's disease. *Int. Rev. Neurobiol.* *119*, 195–232.
- Lee, F.S., and Chao, M.V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 3555–3560.
- Lee, H.-K., Takamiya, K., Han, J.-S., Man, H., Kim, C.-H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., et al. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* *112*, 631–643.
- Lee, S.-J.R., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E.M., and Yasuda, R. (2009). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* *458*, 299–304.
- Lee, Y., Messing, A., Su, M., and Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* *56*, 481–493.
- Lejeune, J., Gauthier, M., and Turpin, R. (1959). [Human chromosomes in tissue cultures]. *Comptes Rendus Hebd. Seances Acad. Sci.* *248*, 602–603.
- Letellier, M., Park, Y.K., Chater, T.E., Chipman, P.H., Gautam, S.G., Oshima-Takago, T., and Goda, Y. (2016). Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E2685-2694.
- Leung, L.S., Peloquin, P., and Canning, K.J. (2008). Paired-pulse depression of excitatory postsynaptic current sinks in hippocampal CA1 in vivo. *Hippocampus* *18*, 1008–1020.
- Leverenz, J.B., and Raskind, M.A. (1998). Early amyloid deposition in the medial temporal lobe of young Down syndrome patients: a regional quantitative analysis. *Exp. Neurol.* *150*, 296–304.
- Li, Y., Du, X.-F., Liu, C.-S., Wen, Z.-L., and Du, J.-L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev. Cell* *23*, 1189–1202.
- Liang, S.-L., Alger, B.E., and McCarthy, M.M. (2014). Developmental increase in hippocampal endocannabinoid mobilization: role of metabotropic glutamate receptor subtype 5 and phospholipase C. *J. Neurophysiol.* *112*, 2605–2615.

Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190.

Liu, B., Filippi, S., Roy, A., and Roberts, I. (2015). Stem and progenitor cell dysfunction in human trisomies. *EMBO Rep.* 16, 44–62.

Liu, Y.-J., Chen, J., Li, X., Zhou, X., Hu, Y.-M., Chu, S.-F., Peng, Y., and Chen, N.-H. (2019). Research progress on adenosine in central nervous system diseases. *CNS Neurosci. Ther.* 25, 899–910.

Lopes, J.P., Pliássova, A., and Cunha, R.A. (2019). The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A1 and A2A receptors. *Biochem. Pharmacol.* 166, 313–321.

Lopes, L.V., Cunha, R.A., and Ribeiro, J.A. (1999). Cross Talk Between A1 and A2A Adenosine Receptors in the Hippocampus and Cortex of Young Adult and Old Rats. *J. Neurophysiol.* 82, 3196–3203.

Lopes, L.V., Cunha, R.A., Kull, B., Fredholm, B.B., and Ribeiro, J.A. (2002). Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neuroscience* 112, 319–329.

Lopes, L.V., Rebola, N., Pinheiro, P.C., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2003). Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *Neuroreport* 14, 1645–1648.

Losin, E.A.R., Rivera, S.M., O'Hare, E.D., Sowell, E.R., and Pinter, J.D. (2009). Abnormal fMRI activation pattern during story listening in individuals with Down syndrome. *Am. J. Intellect. Dev. Disabil.* 114, 369–380.

Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N.A., Schnermann, J., Tieu, K., and Nedergaard, M. (2012). Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6265–6270.

Lu, Y.-M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J.T., Gerlai, R., Wojtowicz, J.M., and Roder, J.C. (1997). Mice Lacking Metabotropic Glutamate Receptor 5 Show Impaired Learning and Reduced CA1 Long-Term Potentiation (LTP) But Normal CA3 LTP. *J. Neurosci.* 17, 5196–5205.

Ludwin, S.K., Kosek, J.C., and Eng, L.F. (1976). The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.* 165, 197–207.

Luo, L. (2021). Architectures of neuronal circuits. *Science* 373, eabg7285.

Lysenko, L.V., Kim, J., Henry, C., Tyrtysnaia, A., Kohnz, R.A., Madamba, F., Simon, G.M., Kleschevnikova, N.E., Nomura, D.K., Ezekowitz, R.A.B., et al. (2014). Monoacylglycerol Lipase Inhibitor JZL184 Improves Behavior and Neural Properties in Ts65Dn Mice, a Model of Down Syndrome. *PLOS ONE* 9, e114521.

Makino, H., and Malinow, R. (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* 64, 381–390.

Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78, 535–538.

Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci.* *16*, 521–527.

Malherbe, P., Kew, J.N.C., Richards, J.G., Knoflach, F., Kratzeisen, C., Zenner, M.-T., Faull, R.L.M., Kemp, J.A., and Mutel, V. (2002). Identification and characterization of a novel splice variant of the metabotropic glutamate receptor 5 gene in human hippocampus and cerebellum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *109*, 168–178.

Malini, S.S., and Ramachandra, N.B. (2007). Possible risk factors for Down syndrome and sex chromosomal aneuploidy in Mysore, South India. *Indian J. Hum. Genet.* *13*, 102–108.

Manita, S., Suzuki, T., Inoue, M., Kudo, Y., and Miyakawa, H. (2007). Paired-pulse ratio of synaptically induced transporter currents at hippocampal CA1 synapses is not related to release probability. *Brain Res.* *1154*, 71–79.

Mannaioni, G., Marino, M.J., Valenti, O., Traynelis, S.F., and Conn, P.J. (2001). Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5 Differentially Regulate CA1 Pyramidal Cell Function. *J. Neurosci.* *21*, 5925–5934.

Manzoni, O.J., Manabe, T., and Nicoll, R.A. (1994). Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* *265*, 2098–2101.

Mao, L., Yang, L., Tang, Q., Samdani, S., Zhang, G., and Wang, J.Q. (2005). The Scaffold Protein Homer1b/c Links Metabotropic Glutamate Receptor 5 to Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Cascades in Neurons. *J. Neurosci.* *25*, 2741–2752.

Marsicano, G., and Lafenêtre, P. (2009). Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* *1*, 201–230.

Martire, A., Tebano, M.T., Chiodi, V., Ferreira, S.G., Cunha, R.A., Köfalvi, A., and Popoli, P. (2011). Pre-synaptic adenosine A2A receptors control cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of striatal glutamatergic neurotransmission. *J. Neurochem.* *116*, 273–280.

Matos, M., Augusto, E., Santos-Rodrigues, A.D., Schwarzschild, M.A., Chen, J.-F., Cunha, R.A., and Agostinho, P. (2012). Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. *Glia* *60*, 702–716.

Matos, M., Augusto, E., Agostinho, P., Cunha, R.A., and Chen, J.-F. (2013). Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and Na⁺/K⁺-ATPase- α 2 controlling glutamate uptake in astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 18492–18502.

Matsumoto, J.P.P., Almeida, M.G., Castilho-Martins, E.A., Costa, M.A., and Fior-Chadi, D.R. (2014). Protein kinase A mediates adenosine A2a receptor modulation of neurotransmitter release via synapsin I phosphorylation in cultured cells from medulla oblongata. *Neurosci. Res.* *85*, 1–11.

Matyash, V., Filippov, V., Mohrhagen, K., and Kettenmann, H. (2001). Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol. Cell. Neurosci.* *18*, 664–670.

McAllister, M.S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R.J., Pedley, K.C., Mayberg, M.R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K.A., and Janigro, D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* *904*, 20–30.

- McCauley, J.P., Petroccione, M.A., D'Brant, L.Y., Todd, G.C., Affinnih, N., Wisnoski, J.J., Zahid, S., Shree, S., Sousa, A.A., De Guzman, R.M., et al. (2020). Circadian Modulation of Neurons and Astrocytes Controls Synaptic Plasticity in Hippocampal Area CA1. *Cell Rep.* 33, 108255.
- McGettigan, C., Warren, J.E., Eisner, F., Marshall, C.R., Shanmugalingam, P., and Scott, S.K. (2011). Neural correlates of sublexical processing in phonological working memory. *J. Cogn. Neurosci.* 23, 961–977.
- Mederos, S., Hernández-Vivanco, A., Ramírez-Franco, J., Martín-Fernández, M., Navarrete, M., Yang, A., Boyden, E.S., and Perea, G. (2019). Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia* 67, 915–934.
- Meme, W., Vandecasteele, M., Giaume, C., and Venance, L. (2009). Electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices. *Neurosci. Res.* 63, 236–243.
- Ménard, C., and Quirion, R. (2012). Successful Cognitive Aging in Rats: A Role for mGluR5 Glutamate Receptors, Homer 1 Proteins and Downstream Signaling Pathways. *PLOS ONE* 7, e28666.
- Mendoza-Fernández, V., Andrew, R.D., and Barajas-López, C. (2000). ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 172–179.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., and Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597.
- Mesuret, G., Khabbazzadeh, S., Bischoff, A.M., Safory, H., Wolosker, H., and Hülsmann, S. (2018). A neuronal role of the Alanine-Serine-Cysteine-1 transporter (SLC7A10, Asc-1) for glycine inhibitory transmission and respiratory pattern. *Sci. Rep.* 8, 8536.
- Metna-Laurent, M., and Marsicano, G. (2015). Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors. *Glia* 63, 353–364.
- Mignery, G.A., Südhof, T.C., Takei, K., and De Camilli, P. (1989). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342, 192–195.
- Miller, S., Sehati, N., Romano, C., and Cotman, C.W. (1996). Exposure of astrocytes to thrombin reduces levels of the metabotropic glutamate receptor mGluR5. *J. Neurochem.* 67, 1435–1447.
- Minakami, R., Katsuki, F., and Sugiyama, H. (1993). A variant of metabotropic glutamate receptor subtype 5: an evolutionally conserved insertion with no termination codon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 622–627.
- Minakami, R., Iida, K., Hirakawa, N., and Sugiyama, H. (1995). The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development. *J. Neurochem.* 65, 1536–1542.
- Mion, S., Corti, C., Neki, A., Shigemoto, R., Corsi, M., Fumagalli, G., and Ferraguti, F. (2001). Bidirectional regulation of neurite elaboration by alternatively spliced metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) isoforms. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 957–972.
- Miya, K., Inoue, R., Takata, Y., Abe, M., Natsume, R., Sakimura, K., Hongou, K., Miyawaki, T., and Mori, H. (2008). Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 510, 641–654.

- Mizuno, G.O., Wang, Y., Shi, G., Wang, Y., Sun, J., Papadopoulos, S., Broussard, G.J., Unger, E.K., Deng, W., Weick, J., et al. (2018). Aberrant Calcium Signaling in Astrocytes Inhibits Neuronal Excitability in a Human Down Syndrome Stem Cell Model. *Cell Rep.* 24, 355–365.
- Mongillo, G., Barak, O., and Tsodyks, M. (2008). Synaptic theory of working memory. *Science* 319, 1543–1546.
- Monory, K., Polack, M., Remus, A., Lutz, B., and Korte, M. (2015). Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3842–3850.
- Mori, A. (2020). How do adenosine A2A receptors regulate motor function? *Parkinsonism Relat. Disord.* 80 Suppl 1, S13–S20.
- Mori, M., Heuss, C., Gähwiler, B.H., and Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J. Physiol.* 535, 115–123.
- Morris, R.G.M. (2003). Long-term potentiation and memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358, 643–647.
- Morris, J.K., Mutton, D.E., and Alberman, E. (2002). Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J. Med. Screen.* 9, 2–6.
- Morris, J.K., Mutton, D.E., and Alberman, E. (2005). Recurrences of free trisomy 21: analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register. *Prenat. Diagn.* 25, 1120–1128.
- Moser, E.I., Kropff, E., and Moser, M.-B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 69–89.
- Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., and Snyder, S.H. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4926–4931.
- Mothet, J.P., Rouaud, E., Sinet, P.-M., Potier, B., Jouvenceau, A., Dutar, P., Videau, C., Epelbaum, J., and Billard, J.-M. (2006). A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5, 267–274.
- Mouro, F.M., Rombo, D.M., Dias, R.B., Ribeiro, J.A., and Sebastião, A.M. (2018). Adenosine A2A receptors facilitate synaptic NMDA currents in CA1 pyramidal neurons. *Br. J. Pharmacol.* 175, 4386–4397.
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.
- Mulkey, R.M., and Zucker, R.S. (1992). Posttetanic potentiation at the crayfish neuromuscular junction is dependent on both intracellular calcium and sodium ion accumulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 4327–4336.
- Murphy, T.H., Blatter, L.A., Wier, W.G., and Baraban, J.M. (1993). Rapid communication between neurons and astrocytes in primary cortical cultures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 2672–2679.

Murray, A., Letourneau, A., Canzonetta, C., Stathaki, E., Gimelli, S., Sloan-Bena, F., Abreghart, R., Goh, P., Lim, S., Baldo, C., et al. (2015). Brief report: isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 33, 2077–2084.

Nadkarni, S., Bartol, T.M., Stevens, C.F., Sejnowski, T.J., and Levine, H. (2012). Short-term plasticity constrains spatial organization of a hippocampal presynaptic terminal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14657–14662.

Nagy, J.I., Pereda, A.E., and Rash, J.E. (2018). Electrical synapses in mammalian CNS: Past eras, present focus and future directions. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1860, 102–123.

Nakahara, K., Okada, M., and Nakanishi, S. (1997). The Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Induces Calcium Oscillations in Cultured Astrocytes via Protein Kinase C Phosphorylation. *J. Neurochem.* 69, 1467–1475.

Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., et al. (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188–201.

Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., and Araque, A. (2012). Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol.* 10, e1001259.

Navarrete, M., Díez, A., and Araque, A. (2014). Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130599.

Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., and Franco, R. (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal* 8, 1088–1097.

Navarro, G., Cordoní, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Perez-Benito, L., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., et al. (2016). Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biol.* 14, 26.

Navarro-Romero, A., Vázquez-Oliver, A., Gomis-González, M., Garzón-Montesinos, C., Falcón-Moya, R., Pastor, A., Martín-García, E., Pizarro, N., Busquets-García, A., Revest, J.-M., et al. (2019). Cannabinoid type-1 receptor blockade restores neurological phenotypes in two models for Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* 125, 92–106.

Nave, K.-A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468, 244–252.

Nelson, D.L., and Gibbs, R.A. (2004). Genetics. The critical region in trisomy 21. *Science* 306, 619–621.

Netzahualcoyotzi, C., and Pellerin, L. (2020). Neuronal and astroglial monocarboxylate transporters play key but distinct roles in hippocampus-dependent learning and memory formation. *Prog. Neurobiol.* 194, 101888.

Neves, G., Cooke, S.F., and Bliss, T.V.P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 65–75.

- Ng, S.K., Higashimori, H., Tolman, M., and Yang, Y. (2015). Suppression of adenosine 2a receptor (A2aR)-mediated adenosine signaling improves disease phenotypes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 267, 115–122.
- Nguyen, P.V., Abel, T., and Kandel, E.R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265, 1104–1107.
- Nicoll, R.A., and Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 863–876.
- Nixdorf-Bergweiler, B.E., Albrecht, D., and Heinemann, U. (1994). Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12, 180–195.
- North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M.L., Cooke, S., Sesay, A., Modino, S., Vanes, L., Hernandez, D., et al. (2005). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science* 309, 2033–2037.
- Offermanns, S., and Simon, M.I. (1995). G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 270, 15175–15180.
- Ogata, K., and Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113, 221–233.
- O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.
- Okubo, Y., Kanemaru, K., Suzuki, J., Kobayashi, K., Hirose, K., and Iino, M. (2019). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2-independent Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum in astrocytes. *Glia* 67, 113–124.
- Oliveira, J.F., Riedel, T., Leichsenring, A., Heine, C., Franke, H., Krügel, U., Nörenberg, W., and Illes, P. (2011). Rodent cortical astroglia express in situ functional P2X7 receptors sensing pathologically high ATP concentrations. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 21, 806–820.
- Ongini, E., and Fredholm, B.B. (1996). Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 364–372.
- O'Riordan, K., Gerstein, H., Hullinger, R., and Burger, C. (2014). The role of Homer1c in metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Hippocampus* 24, 1–6.
- Orr, A.G., Orr, A.L., Li, X.-J., Gross, R.E., and Traynelis, S.F. (2009). Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* 12, 872–878.
- Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Takeyama, M., Ikematsu, K., and Tsuboi, T. (2013). Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 145–151.
- Panatier, A., and Robitaille, R. (2012). The soothing touch: microglial contact influences neuronal excitability. *Dev. Cell* 23, 1125–1126.

- Panatier, A., and Robitaille, R. (2016). Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. *Neuroscience* 323, 29–34.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125, 775–784.
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* 146, 785–798.
- Pankratov, Y., Castro, E., Miras-Portugal, M.T., and Krishtal, O. (1998). A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3898–3902.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., and North, R.A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452, 589–597.
- Pankratov, Y.V., Lalo, U.V., and Krishtal, O.A. (2002). Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 8363–8369.
- Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., et al. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat. Neurosci.* 17, 549–558.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.-P., and Oliet, S.H.R. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150, 633–646.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., and Haydon, P.G. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 310, 113–116.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., and 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.
- Patterson, D. (2009). Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum. Genet.* 126, 195–214.
- Patterson, D., and Costa, A.C.S. (2005). Down syndrome and genetics - a case of linked histories. *Nat. Rev. Genet.* 6, 137–147.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2019). Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press).
- Pedata, F., Dettori, I., Coppi, E., Melani, A., Fusco, I., Corradetti, R., and Pugliese, A.M. (2016). Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology* 104, 105–130.

Peinado, A., Yuste, R., and Katz, L.C. (1993). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10, 103–114.

Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–434.

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

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (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.

Perea, G., Gómez, R., Mederos, S., Covelo, A., Ballesteros, J.J., Schlosser, L., Hernández-Vivanco, A., Martín-Fernández, M., Quintana, R., Rayan, A., et al. (2016). Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *ELife* 5, e20362.

Pereda, A.E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 250–263.

Pereira-Figueiredo, D., Nascimento, A.A., Cunha-Rodrigues, M.C., Brito, R., and Calaza, K.C. (2021). Caffeine and Its Neuroprotective Role in Ischemic Events: A Mechanism Dependent on Adenosine Receptors. *Cell. Mol. Neurobiol.*

Petravicz, J., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2008). Loss of IP₃ receptor-dependent Ca²⁺ increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 4967–4973.

Peverini, L., Beudez, J., Dunning, K., Chataigneau, T., and Grutter, T. (2018). New Insights Into Permeation of Large Cations Through ATP-Gated P2X Receptors. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 265.

Pin, J.-P., and Bettler, B. (2016). Organization and functions of mGlu and GABAB receptor complexes. *Nature* 540, 60–68.

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., and Kanner, B.I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360, 464–467.

Pinto-Duarte, A., Coelho, J.E., Cunha, R.A., Ribeiro, J.A., and Sebastião, A.M. (2005). Adenosine A_{2A} receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 93, 595–604.

van den Pol, A.N., Romano, C., and Ghosh, P. (1995). Metabotropic glutamate receptor mGluR5 subcellular distribution and developmental expression in hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 362, 134–150.

Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1995a). GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in [Ca²⁺]_i. *Glia* 13, 101–112.

Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1995b). Adenosine receptors modulate [Ca²⁺]_i in hippocampal astrocytes in situ. *J. Neurochem.* 65, 1515–1523.

- Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals. *J. Neurosci.* *16*, 5073–5081.
- Pougnnet, J.-T., Toulme, E., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., and Boué-Grabot, E. (2014). ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* *83*, 417–430.
- Qu, C., Gardner, P., and Schrijver, I. (2009). The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by Connexin 30. *Exp. Cell Res.* *315*, 1683–1692.
- Qu, H., Håberg, A., Haraldseth, O., Unsgård, G., and Sonnewald, U. (2000). ¹³C MR spectroscopy study of lactate as substrate for rat brain. *Dev. Neurosci.* *22*, 429–436.
- Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* *468*, 253–262.
- Ransom, C.B., Ransom, B.R., and Sontheimer, H. (2000). Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na⁺ pumps. *J. Physiol.* *522 Pt 3*, 427–442.
- Rebola, N., Pinheiro, P.C., Oliveira, C.R., Malva, J.O., and Cunha, R.A. (2003). Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res.* *987*, 49–58.
- Rebola, N., Rodrigues, R.J., Lopes, L.V., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2005). Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience* *133*, 79–83.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* *11*, 177–184.
- Refaeli, R., Doron, A., Benmelech-Chovav, A., Groysman, M., Kreisel, T., Loewenstein, Y., and Goshen, I. (2021). Features of hippocampal astrocytic domains and their spatial relation to excitatory and inhibitory neurons. *Glia* *69*, 2378–2390.
- Reiche, L., Küry, P., and Göttle, P. (2019). Aberrant Oligodendrogenesis in Down Syndrome: Shift in Gliogenesis? *Cells* *8*, E1591.
- Reichenbach, A., Derouiche, A., and Kirchhoff, F. (2010). Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* *63*, 11–25.
- Reynolds, I.J. (1990). Modulation of NMDA receptor responsiveness by neurotransmitters, drugs and chemical modification. *Life Sci.* *47*, 1785–1792.
- Rice, M.E., and Nicholson, C. (1990). Glutamate- and aspartate-induced extracellular potassium and calcium shifts and their relation to those of kainate, quisqualate and N-methyl-D-aspartate in the isolated turtle cerebellum. *Neuroscience* *38*, 295–310.
- Richtsmeier, J.T., Zumwalt, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J., and Reeves, R.H. (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* *107*, 317–324.

- Robin, L.M., Oliveira da Cruz, J.F., Langlais, V.C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., Busquets-Garcia, A., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Papouin, T., Varilh, M., et al. (2018). Astroglial CB1 Receptors Determine Synaptic D-Serine Availability to Enable Recognition Memory. *Neuron* 98, 935-944.e5.
- Robson, S.C., Sévigny, J., and Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2, 409–430.
- Rolls, E.T., Stringer, S.M., and Trappenberg, T.P. (2002). A unified model of spatial and episodic memory. *Proc. Biol. Sci.* 269, 1087–1093.
- Romano, C., Sesma, M.A., McDonald, C.T., O'Malley, K., Van den Pol, A.N., and Olney, J.W. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 355, 455–469.
- Romano, C., van den Pol, A.N., and O'Malley, K.L. (1996). Enhanced early developmental expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat brain: protein, mRNA splice variants, and regional distribution. *J. Comp. Neurol.* 367, 403–412.
- Rombo, D.M., Newton, K., Nissen, W., Badurek, S., Horn, J.M., Minichiello, L., Jefferys, J.G.R., Sebastiao, A.M., and Lamsa, K.P. (2015). Synaptic mechanisms of adenosine A2A receptor-mediated hyperexcitability in the hippocampus. *Hippocampus* 25, 566–580.
- Ronesi, J.A., Collins, K.A., Hays, S.A., Tsai, N.-P., Guo, W., Birnbaum, S.G., Hu, J.-H., Worley, P.F., Gibson, J.R., and Huber, K.M. (2012). Disrupted Homer scaffolds mediate abnormal mGluR5 function in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat. Neurosci.* 15, 431–440, S1.
- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., and Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74–78.
- Rose, C.R., Ziemens, D., and Verkhratsky, A. (2020). On the special role of NCX in astrocytes: Translating Na⁺-transients into intracellular Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 86, 102154.
- Rosenberg, D., Kartvelishvili, E., Shleper, M., Klinker, C.M.C., Bowser, M.T., and Wolosker, H. (2010). Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 2951–2961.
- Rosenberg, D., Artoul, S., Segal, A.C., Kolodney, G., Radzishevsky, I., Dikopoltsev, E., Foltyn, V.N., Inoue, R., Mori, H., Billard, J.-M., et al. (2013). Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 3533–3544.
- Rosenmund, C., and Stevens, C.F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16, 1197–1207.
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J.D., Bonvento, G., and Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18442–18446.
- Rowland, D.C., Weible, A.P., Wickersham, I.R., Wu, H., Mayford, M., Witter, M.P., and Kentros, C.G. (2013). Transgenically targeted rabies virus demonstrates a major monosynaptic projection from hippocampal area CA2 to medial entorhinal layer II neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 14889–14898.

- Rubio, M.E., and Soto, F. (2001). Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 641–653.
- Rutter, A.R., Fradley, R.L., Garrett, E.M., Chapman, K.L., Lawrence, J.M., Rosahl, T.W., and Patel, S. (2007). Evidence from gene knockout studies implicates Asc-1 as the primary transporter mediating d-serine reuptake in the mouse CNS. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1757–1766.
- Sakers, K., Lake, A.M., Khazanchi, R., Ouwenga, R., Vasek, M.J., Dani, A., and Dougherty, J.D. (2017). Astrocytes locally translate transcripts in their peripheral processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3830–E3838.
- Sala, C., Roussignol, G., Meldolesi, J., and Fagni, L. (2005). Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca²⁺ homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 4587–4592.
- Sanderson, J.L., Gorski, J.A., and Dell’Acqua, M.L. (2016). NMDA Receptor-Dependent LTD Requires Transient Synaptic Incorporation of Ca²⁺-Permeable AMPARs Mediated by AKAP150-Anchored PKA and Calcineurin. *Neuron* 89, 1000–1015.
- Sarantis, K., Tsiamak, E., Kouvaros, S., Papatheodoropoulos, C., and Angelatou, F. (2015). Adenosine A_{2A} receptors permit mGluR5-evoked tyrosine phosphorylation of NR2B (Tyr1472) in rat hippocampus: a possible key mechanism in NMDA receptor modulation. *J. Neurochem.* 135, 714–726.
- Savanthrapadian, S., Meyer, T., Elgueta, C., Booker, S.A., Vida, I., and Bartos, M. (2014). Synaptic properties of SOM- and CCK-expressing cells in dentate gyrus interneuron networks. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 8197–8209.
- Savchenko, V.L., McKanna, J.A., Nikonenko, I.R., and Skibo, G.G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96, 195–203.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5683–5686.
- Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., and Kirchhoff, F. (2001). Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 1270–1272.
- Schmitt, L.I., Sims, R.E., Dale, N., and Haydon, P.G. (2012). Wakefulness affects synaptic and network activity by increasing extracellular astrocyte-derived adenosine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 4417–4425.
- Schools, G.P., and Kimelberg, H.K. (1999). mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J. Neurosci. Res.* 58, 533–543.
- Schulz, J.M., Knoflach, F., Hernandez, M.-C., and Bischofberger, J. (2019). Enhanced Dendritic Inhibition and Impaired NMDAR Activation in a Mouse Model of Down Syndrome. *J. Neurosci.* 39, 5210–5221.

- Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.
- Seifert, G., and Steinhäuser, C. (1995). Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca^{2+} permeability. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1872–1881.
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 5370–5382.
- Serrano, A., Robitaille, R., and Lacaille, J.-C. (2008). Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia* 56, 1648–1663.
- Servitja, J.-M., Masgrau, R., Sarri, E., and Picatoste, F. (1999). Group I Metabotropic Glutamate Receptors Mediate Phospholipase D Stimulation in Rat Cultured Astrocytes. *J. Neurochem.* 72, 1441–1447.
- Shelton, M.K., and McCarthy, K.D. (1999). Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 26, 1–11.
- Sherwood, M.W., Arizono, M., Hisatsune, C., Bannai, H., Ebisui, E., Sherwood, J.L., Panatier, A., Oliet, S.H.R., and Mikoshiba, K. (2017). Astrocytic IP3 Rs: Contribution to Ca^{2+} signalling and hippocampal LTP. *Glia* 65, 502–513.
- Sherwood, M.W., Arizono, M., Panatier, A., Mikoshiba, K., and Oliet, S.H.R. (2021a). Astrocytic IP3Rs: Beyond IP3R2. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 695817.
- Sherwood, M.W., Oliet, S.H.R., and Panatier, A. (2021b). NMDARs, Coincidence Detectors of Astrocytic and Neuronal Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7258.
- Shi, S.H., Hayashi, Y., Petralia, R.S., Zaman, S.H., Wenthold, R.J., Svoboda, K., and Malinow, R. (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284, 1811–1816.
- Shigetomi, E., Bowser, D.N., Sofroniew, M.V., and Khakh, B.S. (2008). Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 6659–6663.
- Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O'Dell, T.J., and Khakh, B.S. (2013). TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 10143–10153.
- Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K., and Torimitsu, K. (2009). Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors. *PLoS Biol.* 7, e1000103.
- Shiraishi, Y., Mizutani, A., Yuasa, S., Mikoshiba, K., and Furuichi, T. (2004). Differential expression of Homer family proteins in the developing mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 473, 582–599.
- Shiratori-Hayashi, M., Yamaguchi, C., Eguchi, K., Shiraishi, Y., Kohno, K., Mikoshiba, K., Inoue, K., Nishida, M., and Tsuda, M. (2021). Astrocytic STAT3 activation and chronic itch require IP3R1/TRPC-dependent Ca^{2+} signals in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147, 1341–1353.

- Siarey, R.J., Stoll, J., Rapoport, S.I., and Galdzicki, Z. (1997). Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology* 36, 1549–1554.
- Silva, G.A., Theriault, E., Mills, L.R., Pennefather, P.S., and Feeney, C.J. (1999). Group I and II metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat spinal cord astrocytes. *Neurosci. Lett.* 263, 117–120.
- Sim, J.A., Chaumont, S., Jo, J., Ulmann, L., Young, M.T., Cho, K., Buell, G., North, R.A., and Rassendren, F. (2006). Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 9006–9009.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., and Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9254–9262.
- Simões, A.P., Machado, N.J., Gonçalves, N., Kaster, M.P., Simões, A.T., Nunes, A., Pereira de Almeida, L., Goosens, K.A., Rial, D., and Cunha, R.A. (2016). Adenosine A2A Receptors in the Amygdala Control Synaptic Plasticity and Contextual Fear Memory. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 2862–2871.
- Smith, D.M., and Mizumori, S.J.Y. (2006). Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus* 16, 716–729.
- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35.
- Sorra, K.E., and Harris, K.M. (1993). Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 3736–3748.
- Stefan, C., Jansen, S., and Bollen, M. (2006). Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal.* 2, 361–370.
- Stefanidis, K., Belitsos, P., Fotinos, A., Makris, N., Loutradis, D., and Antsaklis, A. (2011). Causes of infertility in men with Down syndrome. *Andrologia* 43, 353–357.
- Stellwagen, D., and Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440, 1054–1059.
- Stevens, B., and Fields, R.D. (2000). Response of Schwann cells to action potentials in development. *Science* 287, 2267–2271.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., and Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10955–10959.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C.G., and Charles, A.C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277, 10482–10488.

- Suadicani, S.O., Brosnan, C.F., and Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1378–1385.
- Suarez, R.K. (2012). Energy and metabolism. *Compr. Physiol.* 2, 2527–2540.
- Sun, W., McConnell, E., Pare, J.-F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., Lovatt, D., Han, X., Smith, Y., and Nedergaard, M. (2013). Glutamate-Dependent Neuroglial Calcium Signaling Differs Between Young and Adult Brain. *Science* 339, 197–200.
- Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M.J., Aalling, N., Wang, S., Benraiss, A., Lou, N., Goldman, S.A., et al. (2017). SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 4493–4507.
- Swanson, L.W., Wyss, J.M., and Cowan, W.M. (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.* 181, 681–715.
- Szokol, K., Heuser, K., Tang, W., Jensen, V., Enger, R., Bedner, P., Steinhäuser, C., Taubøll, E., Ottersen, O.P., and Nagelhus, E.A. (2015). Augmentation of Ca(2+) signaling in astrocytic endfeet in the latent phase of temporal lobe epilepsy. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 49.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takano, T., Tian, G.-F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., and Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* 9, 260–267.
- Tang, Y., and Zucker, R.S. (1997). Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron* 18, 483–491.
- Tang, W., Szokol, K., Jensen, V., Enger, R., Trivedi, C.A., Hvalby, Ø., Helm, P.J., Looger, L.L., Sprengel, R., and Nagelhus, E.A. (2015). Stimulation-evoked Ca²⁺ signals in astrocytic processes at hippocampal CA3-CA1 synapses of adult mice are modulated by glutamate and ATP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3016–3021.
- Tao, C.-L., Liu, Y.-T., Sun, R., Zhang, B., Qi, L., Shivakoti, S., Tian, C.-L., Zhang, P., Lau, P.-M., Zhou, Z.H., et al. (2018). Differentiation and Characterization of Excitatory and Inhibitory Synapses by Cryo-electron Tomography and Correlative Microscopy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 1493–1510.
- Tebano, M.T., Martire, A., Potenza, R.L., Grò, C., Pepponi, R., Armida, M., Domenici, M.R., Schwarzschild, M.A., Chen, J.F., and Popoli, P. (2008). Adenosine A(2A) receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *J. Neurochem.* 104, 279–286.
- Teipel, S.J., Schapiro, M.B., Alexander, G.E., Krasuski, J.S., Horwitz, B., Hoehne, C., Möller, H.-J., Rapoport, S.I., and Hampel, H. (2003). Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome. *Am. J. Psychiatry* 160, 1870–1878.
- Tescarollo, F.C., Rombo, D.M., DeLiberto, L.K., Fedele, D.E., Alharfoush, E., Tomé, Â.R., Cunha, R.A., Sebastião, A.M., and Boison, D. (2020). Role of Adenosine in Epilepsy and Seizures. *J. Caffeine Adenosine Res.* 10, 45–60.

- Thimm, D., Knospe, M., Abdelrahman, A., Moutinho, M., Alsdorf, B.B.A., von Kügelgen, I., Schiedel, A.C., and Müller, C.E. (2013). Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster. *Purinergic Signal*. 9, 415–426.
- Thompson, R.J., and Macvicar, B.A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels Austin Tex* 2, 81–86.
- Todd, A.C., Marx, M.-C., Hulme, S.R., Bröer, S., and Billups, B. (2017). SNAT3-mediated glutamine transport in perisynaptic astrocytes in situ is regulated by intracellular sodium. *Glia* 65, 900–916.
- Todd, K.J., Darabid, H., and Robitaille, R. (2010). Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 11870–11882.
- Tomaselli, G., and Vallée, M. (2019). Stress and drug abuse-related disorders: The promising therapeutic value of neurosteroids focus on pregnenolone-progesterone-allopregnanolone pathway. *Front. Neuroendocrinol.* 55, 100789.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496.
- Tronson, N.C., Guzman, Y.F., Guedea, A.L., Huh, K.H., Gao, C., Schwarz, M.K., and Radulovic, J. (2010). Metabotropic glutamate receptor 5/Homer interactions underlie stress effects on fear. *Biol. Psychiatry* 68, 1007–1015.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778–783.
- Turati, J., Ramírez, D., Carniglia, L., Saba, J., Caruso, C., Quarleri, J., Durand, D., and Lasaga, M. (2020). Antioxidant and neuroprotective effects of mGlu3 receptor activation on astrocytes aged in vitro. *Neurochem. Int.* 140, 104837.
- Usowicz, M.M., Gallo, V., and Cull-Candy, S.G. (1989). Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. *Nature* 339, 380–383.
- Uwechue, N.M., Marx, M.-C., Chevy, Q., and Billups, B. (2012). Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J. Physiol.* 590, 2317–2331.
- Vallée, M. (2016). Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160, 78–87.
- Ventura, R., and Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 6897–6906.
- Verkhratsky, A., and Butt, A. (2013). *Glial Physiology and Pathophysiology* (John Wiley & Sons).
- Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389.
- Viana da Silva, S., Haberl, M.G., Zhang, P., Bethge, P., Lemos, C., Gonçalves, N., Gorlewicz, A., Malezieux, M., Gonçalves, F.Q., Grosjean, N., et al. (2016). Early synaptic deficits in the APP/PS1

- mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. *Nat. Commun.* **7**, 11915.
- Vincenzi, F., Pasquini, S., Borea, P.A., and Varani, K. (2020). Targeting Adenosine Receptors: A Potential Pharmacological Avenue for Acute and Chronic Pain. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E8710.
- Vogel, J.K., Weider, M., Engler, L.A., Hillgärtner, S., Schmitt, C., Hermans-Borgmeyer, I., and Wegner, M. (2020). Sox9 overexpression exerts multiple stage-dependent effects on mouse spinal cord development. *Glia* **68**, 932–946.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 626–640.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., et al. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol. Res.* **63**, S191–203.
- Wagner, K.V., Hartmann, J., Labermaier, C., Häusl, A.S., Zhao, G., Harbich, D., Schmid, B., Wang, X.-D., Santarelli, S., Kohl, C., et al. (2015). Homer1/mGluR5 activity moderates vulnerability to chronic social stress. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **40**, 1222–1233.
- Wall, M.J., and Dale, N. (2013). Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *J. Physiol.* **591**, 3853–3871.
- Wall, M.J., Atterbury, A., and Dale, N. (2007). Control of basal extracellular adenosine concentration in rat cerebellum. *J. Physiol.* **582**, 137–151.
- Walz, W., and Lang, M.K. (1998). Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **257**, 127–130.
- Wang, Y.T., and Linden, D.J. (2000). Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron* **25**, 635–647.
- Wang, Y., Fu, W.-Y., Cheung, K., Hung, K.-W., Chen, C., Geng, H., Yung, W.-H., Qu, J.Y., Fu, A.K.Y., and Ip, N.Y. (2021). Astrocyte-secreted IL-33 mediates homeostatic synaptic plasticity in the adult hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2020810118.
- Wijetunge, L.S., Till, S.M., Gillingwater, T.H., Ingham, C.A., and Kind, P.C. (2008). mGluR5 regulates glutamate-dependent development of the mouse somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 13028–13037.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17513–17518.
- Williams-Karnesky, R.L., and Stenzel-Poore, M.P. (2009). Adenosine and stroke: maximizing the therapeutic potential of adenosine as a prophylactic and acute neuroprotectant. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 217–227.
- Witcher, M.R., Kirov, S.A., and Harris, K.M. (2007). Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* **55**, 13–23.

- Wittendorp, M.C., Boddeke, H.W.G.M., and Biber, K. (2004). Adenosine A3 receptor-induced CCL2 synthesis in cultured mouse astrocytes. *Glia* 46, 410–418.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., and Snyder, S.H. (1999). Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13409–13414.
- Wong, J.M., Folorunso, O.O., Barragan, E.V., Berciu, C., Harvey, T.L., Coyle, J.T., Balu, D.T., and Gray, J.A. (2020). Postsynaptic Serine Racemase Regulates NMDA Receptor Function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 40, 9564–9575.
- Wu, S., Wong, K.Y.M., and Tsodyks, M. (2013). Neural information processing with dynamical synapses. *Front. Comput. Neurosci.* 7, 188.
- Wyllie, D.J., Mathie, A., Symonds, C.J., and Cull-Candy, S.G. (1991). Activation of glutamate receptors and glutamate uptake in identified macroglial cells in rat cerebellar cultures. *J. Physiol.* 432, 235–258.
- Xiao, B., Tu, J.C., Petralia, R.S., Yuan, J.P., Doan, A., Breder, C.D., Ruggiero, A., Lanahan, A.A., Wenthold, R.J., and Worley, P.F. (1998). Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21, 707–716.
- Xiao, X.L., Ma, D.L., Wu, J., and Tang, F.-R. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulates proliferation and differentiation of neuronal progenitors in the developmental hippocampus. *Brain Res.* 1493, 1–12.
- Xiong, Z., O’Hanlon, D., Becker, L.E., Roder, J., MacDonald, J.F., and Marks, A. (2000). Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Exp. Cell Res.* 257, 281–289.
- Xu, J., and Wu, L.-G. (2005). The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuron* 46, 633–645.
- Xu, C., Liu, H.-J., Qi, L., Tao, C.-L., Wang, Y.-J., Shen, Z., Tian, C.-L., Lau, P.-M., and Bi, G.-Q. (2020). Structure and plasticity of silent synapses in developing hippocampal neurons visualized by super-resolution imaging. *Cell Discov.* 6, 8.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15194–15199.
- Yassa, M.A., and Stark, C.E.L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 34, 515–525.
- Yasuda, R. (2017). Biophysics of Biochemical Signaling in Dendritic Spines: Implications in Synaptic Plasticity. *Biophys. J.* 113, 2152–2159.
- Ye, Z.-C., Wyeth, M.S., Baltan-Tekkok, S., and Ransom, B.R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3588–3596.

- Yoshida, Y., Matsumoto, N., Tsuchiya, R., Morita, M., Miyakawa, H., and Kudo, Y. (2003). Expression of group I metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal cells in culture and their characterization by intracellular calcium ion dynamics. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 245–251.
- Yoshioka, K., Saitoh, O., and Nakata, H. (2001). Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7617–7622.
- Yu, T., Li, Z., Jia, Z., Clapcote, S.J., Liu, C., Li, S., Asrar, S., Pao, A., Chen, R., Fan, N., et al. (2010). A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2780–2791.
- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6391–6410.
- Zanotti, S., and Charles, A. (1997). Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *J. Neurochem.* 69, 594–602.
- Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). ATP Released by Astrocytes Mediates Glutamatergic Activity-Dependent Heterosynaptic Suppression. *Neuron* 40, 971–982.
- Zhang, Y., Cao, H., Qiu, X., Xu, D., Chen, Y., Barnes, G.N., Tu, Y., Gyabaa, A.T., Gharbal, A.H.A.A., Peng, C., et al. (2020). Neuroprotective Effects of Adenosine A1 Receptor Signaling on Cognitive Impairment Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 202.
- Zhou, Q.Y., Li, C., Olah, M.E., Johnson, R.A., Stiles, G.L., and Civelli, O. (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7432–7436.
- Zhu, X., and Birnbaumer, L. (1996). G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors: Lack of receptor selectivity of G α (16) and evidence for a synergic interaction between G β gamma and the alpha subunit of a receptor activated G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2827–2831.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43–50.
- Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.