



HAL
open science

Déterminants moléculaires de la morphologie astrocytaire et implications physiopathologiques

Anna Capano

► **To cite this version:**

Anna Capano. Déterminants moléculaires de la morphologie astrocytaire et implications physiopathologiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT: 2020SORUS280 . tel-03561045

HAL Id: tel-03561045

<https://theses.hal.science/tel-03561045>

Submitted on 8 Feb 2022

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

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



SORBONNE UNIVERSITÉ

Ecole Doctorale 158 : Cerveau, Cognition et Comportement (ED3C)

Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie (CIRB) – Collège de France
Equipe Rouach : Interactions Neurogliales dans la Physiopathologie Cérébrale

Déterminants moléculaires de la morphologie astrocytaire et implications physiopathologiques

Anna Capano

Thèse de Doctorat en Neurosciences

Dirigée par Nathalie Rouach

Présentée et soutenue publiquement le 7 Février 2020
Devant un jury composé de :

| | |
|---------------------|---------------------|
| Dr. Bruno GUIARD | Président |
| Dr. Hirc GURDEN | Rapporteur |
| Dr. Jacques BARIK | Rapporteur |
| Dr. Carole ESCARTIN | Examinatrice |
| Dr. Peter VANHOUTTE | Examineur |
| Dr. Nathalie ROUACH | Directrice de thèse |

Publications

Articles

1) A. Capano, A. Rancillac, J. Zapata, P. Ezan, J.P. Tassin, B. Guiard, N. Rouach. Astrocytes modulate cocaine-induced synaptic plasticity and behavior.

In preparation

2) A. Capano, E. Hardy, L.E. Pillet, P. Ezan, C. Escartin, N. Rouach. Astroglial reactivity and Cx30 expression: a positive feedback loop.

In preparation

3) A. Capano*, D. Mazaud*, J. Zapata, N. Rouach. Astroglial calcium signaling controls astroglial morphology and synaptic coverage.

In submission process

Review

D. Mazaud*, A. Capano*, N. Rouach. The many ways astroglial connexins controls neurotransmission.

*Equally contributing authors.

Liste des Abréviations

AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique
ATP : Adenosine TriPhosphate
ARN(m): Acide RiboNucléique (messenger)
CPP : acide (RS)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl-)propyl-1-phosphonic
Cx : Connexine
DA : Dopamine
DOPAC : Acide 3,4-Dihydroxyphenylacetic
DSM : Manuel Diagnostique et Statistique
EAAT : Transporteur d'Acide Aminé Excitateur
GABA : acide gamma aminobutyrique
GFAP : Protéine acide gliale fibrillaire
GLT : Glutamate Transporteur
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Pression
Iba 1 : Molécule 1 d'adaptateur ionisé lié au calcium
IL1a : Interleukine 1 alpha
IP₃ : phosphatidylinositol 4,5-triphosphate
JAK : Janus Kinase
kDa : kilo Dalton
LTD : Depression Long-Terme
LTP : Potentiation Long-Terme
mGluR : Récepteur Métabotrope au Glutamate
MSN : Neurones moyens épineux
NAc : Noyau Accumbens
NFkB : Facteur Nucléaire kappa, chaîne légère
NMDA : N-methyl-D-aspartate
PAP : Prolongement Astrocytaires Perisynaptique
PFC : Cortex Préfrontal
STAT : Signal Transducteur et Activateur de la Transcription 3
TGF- β 1 : Facteur de Croissance Transformant beta-1
TNF α : Facteur alpha de tumeur nécrosée
VGLUT1 : Transporteur Vésiculaire au Glutamate 1
VTA : Aire Tegmentale Ventrale
xCT : Echangeur Cystine-Glutamate
 γ -DGG : gamma-D-Glutamylglycine

Liste des Figures

Figure 1. Comparaison de la morphologie des astrocytes murins et humains

Figure 2. Développement des astrocytes

Figure 3. Délimitation des domaines astrocytaires

Figure 4. Mécanismes de libération de gliotransmetteurs

Figure 5. Les connexines, siège de la communication intercellulaire astrocytaire

Figure 6. La connexine 30 astrocytaire contrôle l'invasion synaptique des PAPs

Figure 7. Différentes voies de signalisation de la réactivité astrocytaire

Figure 8. Modifications morphologiques des astrocytes réactifs

Figure 9. Les différentes parties du cerveau impliquées dans les phases de l'addiction

Figure 10. Schéma du circuit de la récompense chez la souris

Figure 11. Mode d'action de la cocaïne

Figure 12. Modèle de plasticité structurale des épines dendritiques mise en place lors de l'addiction

Figure 13. Dérèglement de l'homéostasie du glutamate à la synapse PFC-NAc après administration de drogue

Figure 14. La Cx30 régule les effets locomoteurs de la cocaïne via sa fonction non canal

Figure 15. Augmentation des niveaux de Cx30 dans le NAc après administration de cocaïne

Figure 16. Les niveaux d'ARNm de la Cx30 sont inchangés par la cocaïne

Figure 17. La cocaïne ne change pas l'expression de la Cx30 dans le NAc de souris IP3R2-/-

Figure 18. La cocaïne induit un changement d'expression de la Cx30 dans le NAc et le cortex préfrontal, mais pas dans le cortex médian

Figure 19. Les seuls changements de niveaux de Cx30 dans le NAc ne modifient pas la sensibilisation locomotrice à la cocaïne

Figure 20. La cocaïne induit des changements de morphologie astrocytaire dans le NAc des souris sauvages mais pas dans les souris déficientes en Cx30

Figure 21. La cocaïne induit un rapprochement des prolongements astrocytaires de la synapse dans le NAc de façon Cx30-dépendante

Figure 22. La cocaïne induit une réactivité astrocytaire dans le NAc des souris sauvages, qui est Cx30-dépendante

Figure 23. Inhiber la réactivité astrocytaire dans le NAc réduit l'activité locomotrice induite par la cocaïne et supprime la sensibilisation à la cocaïne

Figure 24. La Cx30 est nécessaire à la sensibilisation à l'amphétamine, qui régule l'expression de la Cx30 et la morphologie des astrocytes du NAc

Figure 25. Altération de la transmission synaptique glutamatergique induite par la cocaïne sur les MSNs du NAc sous-tendue par l'absence de Cx30

Figure 26. Modifications du ratio DOPAC/DA dans le NAc après injections de cocaïne dans les souris sauvages et déficientes en Cx30

Figure 27. Modification du ratio DOPAC/DA dans le PFC

Figure 28. Modifications des niveaux de dopamine du NAc induits par la cocaïne dans les souris sauvages et déficientes en Cx30

Figure 29. La Cx30, induite dans un modèle de blessure *in vivo*, contribue à la réactivité astrocytaire

Figure 30. La Cx30 est augmentée dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal

Figure 31. Une déficience en Cx30 inhibe la réactivité astrocytaire dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal

Figure 32. L'activation directe de la voie JAK/STAT, sous-tendant la réactivité astrocytaire, augmente l'expression de la Cx30

Figure 33. La surexpression de Cx30 induit une réactivité astrocytaire

Figure 34. Schéma récapitulatif des modifications induites par la cocaïne observées dans le NAc

Figure 35. Schéma récapitulatif des observations sur le rôle de la Cx30 dans la réactivité astrocytaire

Liste des Tableaux

Tableau 1. Canaux ioniques astrocytaires

Tableau 2. Changements moléculaires d'un astrocyte réactif

Tableau 3. Liste des anticorps utilisés

Table des Matières

| | |
|---|----|
| Publications | 1 |
| Liste des Abréviations | 3 |
| Liste des Figures | 4 |
| Liste des Tableaux | 6 |
| Table des Matières | 7 |
| Résumé | 13 |
| Introduction | 17 |
| Chapitre I : Les Astrocytes | 19 |
| 1. Généralités | 19 |
| 1.1 Bref historique | 19 |
| 1.2. Propriétés | 20 |
| 1.3. Fonctions | 29 |
| 2. La synapse tripartite | 32 |
| 2.1. La couverture synaptique | 32 |
| 2.2. Les fonctions astrocytaires à la synapse – la gliotransmission | 32 |
| 2.3. La capture du glutamate | 34 |
| 3. Les connexines astrocytaires | 35 |
| 3.1. Les propriétés des connexines astrocytaires | 35 |
| 3.2. Rôle des connexines astrocytaires dans la neurotransmission | 38 |
| 4. Le calcium astrocytaire | 42 |
| 4.1. Propriétés | 42 |
| 4.2. Fonctions | 43 |
| 4.3. Les méthodes d'étude du calcium astrocytaire | 44 |
| 5. La réactivité astrocytaire | 46 |
| 5.1. Définitions et généralités | 46 |
| 5.2. Implication et rôle en physiopathologie cérébrale | 46 |
| 5.3. Mécanismes d'induction de la réactivité astrocytaire | 47 |
| 5.4. Comment reconnaître un astrocyte réactif ? | 49 |
| Chapitre II : L'Addiction | 53 |
| 1. Définition et contexte | 53 |
| 1.1. Historique du terme « addiction » | 53 |
| 1.2. La définition du DSM | 54 |
| 1.3. L'addiction en recherche | 55 |
| 2. Le circuit de la récompense | 57 |
| 2.1. L'aire tegmentale ventrale, génératrice de dopamine | 57 |
| 2.2. Le cortex préfrontal ou le siège de la subjectivité | 58 |
| 2.3. Le noyau accumbens, à la croisée des chemins | 59 |
| 3. L'action des drogues, exemple de la cocaïne | 61 |

| | |
|--|-----|
| 3.1. Pharmacologie de la cocaïne | 61 |
| 3.2. Changements induits par la cocaïne dans le Noyau Accumbens .. | 62 |
| 3.3. Modèles d'étude comportementale la sensibilisation locomotrice | 66 |
| Chapitre III : Rôle des Astrocytes dans l'Addiction à la cocaïne : Implication dans le Noyau Accumbens | 69 |
| 1. Rôle des astrocytes dans la synaptopathie glutamatergique | 69 |
| 1.1. L'hypothèse de l'homéostasie au glutamate | 69 |
| 1.2. Modulation des autres récepteurs glutamatergiques | 70 |
| 2. Rôle des astrocytes dans la synpatopathie dopaminergique | 72 |
| 3. Autres modifications astrocytaires induites par la cocaïne | 74 |
| Objectifs de l'étude..... | 75 |
| Matériels et Méthodes | 77 |
| Partie I : Matériel | 79 |
| 1. Produits chimiques | 79 |
| 2. Injections intracérébrales | 80 |
| 3. Electrophysiologie | 80 |
| 4. Activité locomotrice | 81 |
| 5. Lignées transgéniques | 81 |
| 6. Microscopie et logiciels | 82 |
| Partie II : Méthodes | 83 |
| 1. Sensibilisation à la cocaïne | 83 |
| 2. Immunohistochimie et Immunoblot | 83 |
| 3. Injections intracérébrales stéréotaxiques | 83 |
| 4. Electrophysiologie | 83 |
| 5. Mesure de l'activité locomotrice | 84 |
| Résultats | 87 |
| Partie I : le calcium intracellulaire contrôle la morphologie astrocytaire et la couverture synaptique | 89 |
| Article | 90 |
| Partie II : Les astrocytes modulent la plasticité et le comportement induits par la cocaïne | 107 |
| 1. La connexine 30 module l'effet locomoteur de la cocaïne | 107 |
| 1.1. L'activité locomotrice induite par la cocaïne est réduite en l'absence de Cx30 astrogliale | 107 |
| 1.2. L'effet de la Cx30 astrocytaire sur l'activité locomotrice induite par la cocaïne est sous-tendu par les fonctions non-canal | |

| | |
|---|-----|
| de la Cx30 | 108 |
| 2. Modifications astrocytaires dans le NAc induites par la cocaïne | 110 |
| 2.1. Augmentation de l'expression de la Cx30 dans le NAc induite par la cocaïne | 110 |
| 2.2. Eléments du mécanisme de régulation de l'expression de la Cx30 par la cocaïne | 111 |
| 2.3. Spécificité de l'augmentation de l'expression de la Cx30 par la cocaïne dans le NAc | 113 |
| 2.4. L'activité locomotrice induite par la cocaïne n'est pas dépendante des niveaux de Cx30 dans le NAc | 115 |
| 2.5. La morphologie des astrocytes est modifiée par la cocaïne de façon Cx30-dépendante | 117 |
| 2.6. La cocaïne modifie la couverture astrogliale des synapses . excitatrices du NAc de façon Cx30-dépendante | 119 |
| 2.7. Induction d'une réactivité astrogliale par la cocaïne | 121 |
| 2.8. Réduire la réactivité des astrocytes du NAc des souris sauvages réduit l'activité locomotrice induite par la cocaïne..... | 123 |
| 2.9. La Cx30 régule la sensibilisation à l'amphétamine, qui contrôle également l'expression de la Cx30 et la morphologie des astrocytes | 125 |
| 3. Rôle de la cx30 astrocytaire sur la neurotransmission glutamatergique dans le NAc | 129 |
| 3.1. Altérations des évènements spontanés | 129 |
| 3.2. Modifications des niveaux de glutamate ambiant et libéré | 130 |
| 4. Influence de la Cx30 astrocytaire du NAc sur les niveaux de dopamine .. | 134 |
| 4.1. Quantification des niveaux DOPAC/Dopamine à partir de lysats de NAc | 134 |
| 4.2. Quantification des niveaux de DA dans le cortex préfrontal | 135 |
| 4.3. Quantification des niveaux de DA extracellulaire dans le NAc . | 137 |
| Partie III : Réactivité astrogliale et Connexine 30 : une boucle positive de retrocontrôle..... | 141 |
| 1. La Cx30 est augmentée en conditions réactives, et la réactivité est altérée par l'absence de Cx30 | 141 |
| 1.1. Modèle de blessure in vivo | 141 |
| 1.2. Modèle d'épilepsie du lobe temporal | 144 |
| 2. L'activation spécifique de la voie JAK/STAT augmente l'expression de la Cx30 | 146 |
| 3. La surexpression de la Cx30 induit une réactivité astrogliale | 148 |
| Discussion et Perspectives | 153 |

| | |
|---|---------|
| Partie I : Calcium et morphologie | 155 |
| 1. Le calcium intracellulaire régule la morphologie des astrocytes | 155 |
| 2. Comment le calcium influe sur la morphologie astrocytaire ? | 156 |
| 3. Perspectives | 157 |
| Partie II : Cocaïne et Cx30 | 159 |
| 1. Les modifications astrocytaires induites par la cocaïne dans le NAc | 159 |
| 1.1. Les changements d'expression endogène de la Cx30 dans le NAc | 160 |
| 1.2. La cocaïne régule l'arborisation astrocytaire de façon Cx30-dépendante | 161 |
| 1.3. Induction d'une réactivité astrocytaire par la cocaïne | 163 |
| 2. Modifications des transmissions glutamatergique et dopaminergique dans le NAc | 163 |
| 2.1. Changements de la transmission glutamatergique dans le NAc en l'absence de Cx30 | 163 |
| 2.2. Changement de la transmission dopaminergique dans le NAc en l'absence de Cx30 | 165 |
| 2.3. Lien entre les changements de transmissions dopaminergique et glutamatergique | 167 |
| 3. Les Astrocytes comme cibles thérapeutiques potentielles contre les effets de la cocaïne et la mise en place d'une addiction | 168 |
| 3.1. Inhibition de la réactivité astrocytaire dans le NAc | 168 |
| 3.2. Altération de fonctions astrocytaires | 168 |
| Partie III : Cx30 et réactivité astrocytaire | 171 |
| 1. La Cx30, un marqueur de la réactivité astrocytaire ? | 171 |
| 2. La Cx30, un inducteur de la réactivité astrocytaire ? | 172 |
| 2.1. Inhibition de la réactivité astrocytaire en absence de Cx30 | 172 |
| 2.2. Mise en place d'une réactivité astrocytaire sous le contrôle de la Cx30 | 173 |
| Bibliographie | 177 |
| Remerciements | 223 |

Résumé

Les Astrocytes sont des cellules majeures du système nerveux central, aux propriétés et fonctions diverses. Ces cellules interagissent avec de nombreux éléments et cellules du cerveau, et sont impliquées dans la plupart, voire toutes, les fonctions cérébrales. Notamment, ce sont des acteurs majeurs de la neurotransmission, comme le troisième élément de la synapse tripartite, à travers des fonctions notamment de gliotransmission. Au cours de cette thèse, nous avons étudié plusieurs mécanismes par lesquels les astrocytes contrôlent les fonctions neuronales, au fil de différents projets.

Dans un premier projet, nous nous sommes interrogés sur le rôle du calcium astrocytaire dans les changements morphologiques des astrocytes et leur couverture des synapses. Ainsi, nous avons modifié les concentrations intracellulaires de calcium, à l'aide de plusieurs techniques classiquement utilisées dans la littérature, et nous avons analysé divers paramètres de morphologie astrocytaire, et de couverture synaptique dans l'hippocampe.

Ici, nous avons observé que les réductions de concentrations calciques astrocytaires modifient la morphologie des astrocytes, et notamment induisent le développement d'une morphologie plus complexe, ainsi qu'une augmentation de la couverture synaptique. Nous avons donc conclu que l'étude du rôle du calcium astrocytaire est d'autant plus complexe que le modifier induit en soi des changements de morphologie et de couverture synaptique qui intrinsèquement pourraient influencer la transmission synaptique, indépendamment des effets sur la gliotransmission.

Ce projet remet en question certaines interprétations d'expériences utilisant très largement la technique de chélation calcique dans la recherche sur le rôle du calcium astrocytaire dans la neurotransmission et les mécanismes sous-jacents. Dans cette thèse, nous montrons que la chélation calcique astrogliale induit des **changements morphologiques astrocytaires importants**.

Dans un deuxième projet, nous avons étudié l'influence des astrocytes dans les mécanismes de synaptopathies de l'addiction, et notamment via le rôle de la Cx30. Dans le laboratoire, il a été mis en évidence un nouveau rôle des astrocytes dans la régulation de la transmission synaptique. En effet, il a été montré qu'en l'absence de Cx30, une protéine astrocytaire membranaire des jonctions communicantes, les astrocytes avaient des prolongements plus grands. Ces prolongements astrocytaires perisynaptiques s'insèrent dans les synapses glutamatergiques de l'hippocampe et empêchent la mise en place d'une plasticité glutamatergique. Par ailleurs, il a été montré que les défauts de transmission glutamatergique dans le circuit de la récompense, et notamment dans le noyau accumbens, sont à l'origine de la mise en place des mécanismes de l'addiction sur le long-terme. En effet, l'augmentation des niveaux synaptiques de glutamate induit une réponse postsynaptique exacerbée, qui a des effets comportementaux sur le long-terme.

Ainsi, nous nous sommes posés la question de savoir si la Cx30 pourrait avoir un rôle dans la synaptopathie glutamatergique du NAc mise en cause dans les mécanismes de l'addiction à la cocaïne.

Dans un premier temps, nous avons investigué le rôle de la Cx30 dans l'activité locomotrice induite par la cocaïne. Nous avons utilisé le protocole de sensibilisation à la cocaïne, et calculé l'activité locomotrice de souris après injections de cocaïne ou de solution saline pendant cinq jours consécutifs. Nous avons observé que les souris déficientes en Cx30 ont une activité locomotrice induite par la cocaïne réduite comparée à celle présente dans les souris sauvages. De plus, à l'aide de l'utilisation d'une lignée transgénique où les fonctions canal de la Cx30 sont altérées, nous avons pu conclure que ces effets de la Cx30 étaient dus à des fonctions canal-indépendantes de la Cx30.

Dans un second temps, nous avons analysé les effets de la cocaïne sur les astrocytes du NAc de souris sauvages et déficientes en Cx30. Après un protocole de sensibilisation à la cocaïne, nous avons observé plusieurs changements dans les astrocytes du NAc. D'abord, les niveaux de Cx30 étaient augmentés, de manière dépendante de l'activité calcique astrocytaire et non-transcriptionnelle. Cette augmentation n'est pas ubiquitaire dans tout le cerveau puisqu'elle est observée dans le NAc et dans le PFC mais pas dans le cortex médian. Cependant, rétablir l'expression de Cx30 dans le NAc des souris déficientes en Cx30 ne suffit pas pour rétablir une activité locomotrice induite par la cocaïne semblable à celle observée dans les souris sauvages. Par ailleurs, nous observons après administration de cocaïne une diminution de la complexité morphologique des astrocytes, ainsi qu'une mise en place de réactivité astrocytaire, via des mécanismes dépendants de la Cx30. Ce changement de complexité morphologique s'accompagne d'un changement de la couverture synaptique astrocytaire dans le NAc. En effet, après un protocole de sensibilisation à la cocaïne, les prolongements astrocytaires pérисynaptiques sont plus proches des synapses que ceux des souris traitées à la solution saline. Cependant, ce changement n'est pas observé dans les souris déficientes en Cx30. Nous avons donc pu conclure à une influence de la cocaïne sur les propriétés astrocytaires dans le NAc, dépendante de la Cx30. De plus, des changements similaires et dépendants de la Cx30 ont été observés dans le NAc de souris traitées à l'amphétamine.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressées à l'influence de la Cx30 sur les modifications synaptiques induites par la cocaïne. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de patch-clamp sur les MSNs dans le NAc. Ainsi, nous avons observé une diminution de la transmission glutamatergique après injections de cocaïne dans les MSNs du NAc des souris déficientes en Cx30, comparée à celle observée dans les souris sauvages. Ensuite, nous avons utilisé des techniques de mesure de concentration dopaminergiques par HPLC, pour étudier les niveaux de dopamine du NAc en l'absence de Cx30. En l'absence de Cx30, nous avons observé une baisse des niveaux dopaminergiques de base et des augmentations des niveaux de dopamine dans le NAc après injections de cocaïne, comparé à ceux observés dans les souris sauvages. Nous avons donc conclu que la Cx30 est nécessaire à l'augmentation de la transmission glutamatergique du NAc et des augmentations dopaminergiques induites par la cocaïne.

En conclusion, ce projet a permis de mettre en évidence le **rôle de la Cx30 astrocytaire sur divers mécanismes mis en place lors du développement d'une addiction à la cocaïne**, et de suggérer la Cx30, et certaines fonctions spécifiques de celle-ci, comme cible thérapeutique potentielle dans la mise en place d'une synaptopathie sous-tendant l'addiction.

Dans un troisième projet, nous nous sommes intéressées au lien entre la Cx30 et la réactivité astrocytaire. En effet, nous avons observé que la cocaïne induit une réactivité des astrocytes qui est corrélée à une augmentation de l'expression de la Cx30.. Nous nous sommes donc demandées s'il existe un lien entre la Cx30 et la réactivité astrocytaire. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles de réactivité astrocytaire dans différents contextes pathologiques et réalisé différents marquages de réactivité astrocytaire et de Cx30.

D'abord, nous avons observé une augmentation de Cx30 dans toutes les conditions de réactivité astrocytaire testées (cocaïne, blessure in vivo, épilepsie). Ensuite, nous avons utilisé ces mêmes modèles dans des souris déficientes en Cx30. Nous avons pu observer une inhibition de la réactivité astrocytaire dans ces modèles, ce qui nous a permis de conclure que la Cx30 est un acteur clé de la mise en place d'une réactivité astrocytaire.

Ensuite, nous avons utilisé un modèle d'induction de réactivité astrocytaire via l'activation d'une voie de signalisation spécifique, la voie JAK/STAT3, afin de déterminer si la seule mise en place d'une réactivité astrocytaire induit un changement de niveaux de Cx30. Et en effet, nous observons dans ce modèle une augmentation des niveaux de Cx30, ce qui nous a permis de conclure que la voie JAK/STAT3, impliquée dans la mise en place de réactivité astrocytaire, contrôle directement l'expression de la Cx30 est une condition obligatoire à la réactivité astrocytaire.

Enfin, nous avons voulu savoir si les changements de niveau de Cx30 pouvaient induire une réactivité astrocytaire. Nous avons donc utilisé un vecteur viral spécifique pour induire une surexpression de Cx30, et nous avons observé l'expression de plusieurs marqueurs de réactivité astrocytaire. Ainsi, nous observons la mise en place d'un profil de réactivité astrocytaire à la suite d'une surexpression de Cx30. Nous pouvons donc conclure que l'augmentation de Cx30 est un paramètre suffisant à l'induction d'une réactivité astrogliale.

Ce projet a permis de mettre en lumière **la Cx30 comme acteur majeur de la réactivité astrocytaire**, et donc comme potentielle cible thérapeutique pour l'inhibition d'une réactivité astrocytaire, nocive dans certaines pathologies.

INTRODUCTION

Chapitre I- Les Astrocytes

1. GENERALITES

1.1. Bref historique

Les cellules gliales, ainsi nommées par Ludwig Karl Virchow en 1858, étaient décrites à l'origine comme du « tissu connectif » ou du « ciment » dans lequel les neurones étaient enchâssés. Plus tard, l'apparition de nouvelles techniques de marquage, à l'instar de la coloration au nitrate d'argent développée par Camillo Golgi, ont permis d'identifier plus précisément les cellules gliales. C'est d'ailleurs en 1893 que Michael von Lenhossek a proposé le nom « astrocyte » à ces cellules à forme étoilée identifiées par le marquage de Golgi (Lenhossek, 1895). Les cellules gliales se trouvent en aussi grands nombres que les neurones dans un cerveau humain, bien qu'une théorie largement reprise proposait qu'elles soient dix fois plus nombreuses que les neurones (Bartheld et al., 2016). Carl Ludwig Schleich proposa l'année d'après que les cellules gliales pourraient être des partenaires actifs des neurones, et introduisit ainsi l'idée d'« interactions neurogliales ». Au début du 20^{ème} siècle, le fameux neuroanatomiste Santiago Ramón y Cajal émit même les hypothèses que les astrocytes interagissaient avec les vaisseaux sanguins au niveau de leurs terminaisons (maintenant nommées « pieds astrocytaires ») et que la glie radiaire se différenciait en astrocyte à la fin de la neurogenèse. De plus, à l'époque les différentes classes d'astrocytes aujourd'hui connues ont été définies.

Il a fallu attendre la fin du siècle pour assister à une nouvelle vague de découvertes sur les cellules gliales et plus particulièrement les astrocytes. Grâce à des méthodes d'électrophysiologie, il était connu que les astrocytes n'étaient pas électriquement excitables, mais la culture cellulaire a permis de montrer qu'ils exprimaient des récepteurs aux neurotransmetteurs, et qu'ils réagissaient notamment à l'application de glutamate, de GABA, et d'autres acides aminés (Bowman & Kimelberg, 1984; Bowman, Kimelberg, Frangakis, Berwald-Netter, & Edwards, 1984; Kettenmann, Backus, & Schachner, 1984). Ainsi, l'idée émise était que ces cellules pouvaient réagir à des signaux chimiques et en transmettre à leur tour, les rendant ainsi acteurs secondaires de la neurotransmission. Une dizaine d'années plus tard, l'identification des modalités d'interaction des astrocytes avec les neurones a été initiée, via notamment la mise en évidence des augmentations transitoires de leur niveau de calcium intracellulaire qui seraient à l'origine de la libération de transmetteurs (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994) (cf. partie 4 de ce chapitre). Ainsi, le champ de recherche sur l'implication des astrocytes, de leurs signaux et de leur influence sur la transmission neuronale s'est ouvert. A la synapse, les astrocytes sont considérés quelques années plus tard comme le troisième partenaire inévitable de la désormais nommée « synapse tripartite » (Araque, Parpura, Sanzgiri, & Haydon, 1999).

Dans l'équipe du Dr. Nathalie Rouach et au cours de ma thèse, nous nous intéressons toujours plus en détail au rôle des astrocytes dans la neurotransmission.

1.2. Propriétés

1.2.1. Phylogénie

Les astrocytes apparaissent tôt au cours de l'évolution et se sont développés de manière assez frappante en taille, nombre et diversité. Chez l'homme, elles représentent les cellules non-neuronales les plus abondantes du cerveau et possèdent une taille et des fonctions complexes et remarquables, ce qui sous-tend à penser que leur évolution est concomitante avec la complexité grandissante des circuits neuronaux (Oberheim et al., 2009). En plus de leur taille, leur nombre est aussi augmenté au cours l'évolution, un ratio glie-sur-neurone est d'ailleurs calculé pour différentes espèces et représente la proportion relative d'astrocytes par rapport aux neurones. Plus ce ratio est élevé, plus le nombre d'astrocytes par rapport au nombre de neurones est important. Ainsi, *Caenorhabditis elegans* possède un ratio de 0.18 (302 neurones pour 56 cellules gliales), le cortex du rat a un ratio de 0.4 et le cerveau humain un ratio de 1 (Azevedo et al., 2009; Bass, Hess, Pope, & Thalheimer, 1971; Oikonomou & Shaham, 2011). De plus, la comparaison de ce ratio dans différentes aires corticales des primates révèle une augmentation chez l'homme comparé à d'autres primates (C. C. Sherwood et al., 2006). Même s'il est faux d'extrapoler de ce ratio un lien direct entre les fonctions cognitives supérieures et les astrocytes, il est vrai que les astrocytes humains, de par leur complexité, sont des acteurs importants de ces fonctions. Ceci est démontré dans une étude où la transplantation d'astrocytes humains dans des cerveaux de souris a permis une amélioration des performance lors de tâches cognitives (X. Han et al., 2013).

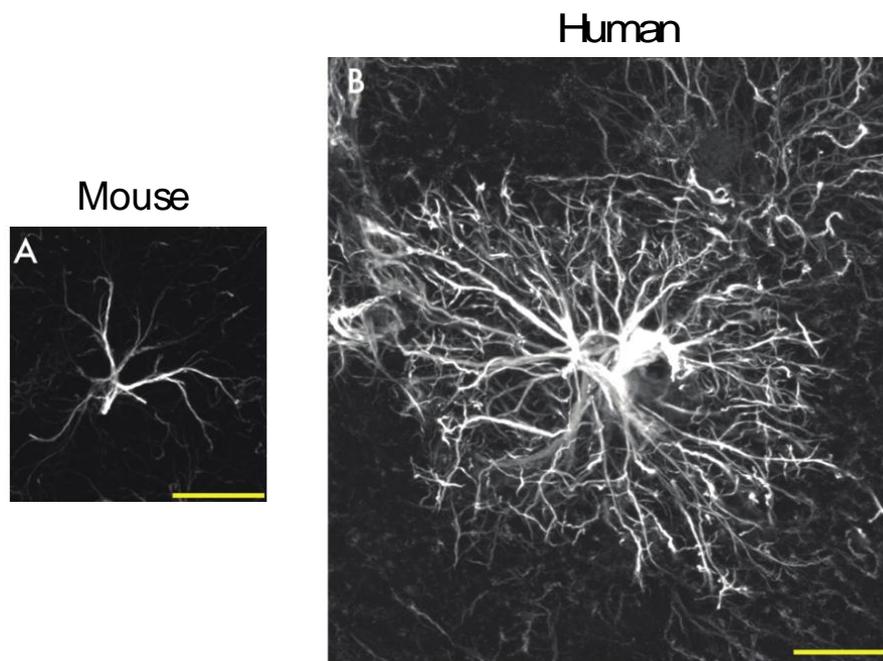


Figure 1 : Comparaison de la morphologie des astrocytes murins et humains. Marquage GFAP d'astrocytes corticaux chez la souris (gauche) et l'homme (droite). Barre de calibration : 20 μ m. Modifié à partir d'Oberheim et al., 2009.

1.2.2. Formation et développement

Les astrocytes, tout comme les neurones et les oligodendrocytes, proviennent du tissu neuroépithélial. Les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire donnent

naissance à des neurones ou à d'autres cellules neurales, qui deviennent ensuite gliogéniques (Deneen et al., 2006). Au cours du développement, les glies radiaires pluripotentes se transforment en astrocytes, qui peuvent se diviser et proliférer. Pour devenir astrocyte, un des signaux d'astrogénèse connu et identifié est celui de la Janus Kinase-Signal transducteur et activateur de la transcription (JAK/STAT), activé par des cytokines telles que le ciliary neurotrophic factor (CNTF), le leukemia inhibitory factor (LIF) et la cardiotrophin-1 (CT-1), cette dernière étant sécrétée par les neurones nouvellement formés (Barnabé-Heider et al., 2005; F. He et al., 2005). L'activité de STAT3 est cruciale à l'astrogénèse (Figure 2), notamment par son interaction avec le complexe de co-activateurs p300/CBP qui initie l'expression des gènes GFAP et S100 β , deux marqueurs astrocytaires (Urayama et al., 2013).

Ensuite, les astrocytes migrent dans le système nerveux central, à l'aide des glies radiaires qui projettent de longs prolongements à travers toutes les couches corticales (Figure 2). Ils prolifèrent ensuite lors des premières semaines postnatales (Bandeira, Lent, & Herculano-Houzel, 2009). Une division locale a ensuite lieu et génère la moitié des astrocytes matures du cortex (Ge, Miyawaki, Gage, Jan, & Jan, 2012). On estime donc que la prolifération des astrocytes se fait de manière symétrique (génération de progéniteurs astrocytaires par la glie radiaire dans la zone ventriculaire) et asymétrique (production de nouveaux astrocytes après la migration) (A. V. Molofsky & Deneen, 2015).

Il semblerait que l'hétérogénéité des astrocytes soit prédéterminée au cours du développement. En effet, chez le poulet, trois sous-populations astrocytaires ont été identifiées, en fonction de leur position sur l'axe dorso-ventral, et d'un schéma unique d'expression de marqueurs comme la Reelin et Slit1 (Hochstim, Deneen, Lukaszewicz, Zhou, & Anderson, 2008). Ces astrocytes deviennent ensuite fonctionnels via des interactions avec leur environnement, notamment par l'augmentation de l'activité neuronale excitatrice. En effet, il a notamment été montré que l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate astrocytaires, les mGluR5s, régule l'activation et la maturation des transporteurs VGlut1 neuronaux, nécessaires à la transmission glutamatergique (Morel, Higashimori, Tolman, & Yang, 2014). Ces signaux environnementaux étant spécifiques, les astrocytes développent une hétérogénéité dans l'expression de leur répertoire moléculaire en fonction de leur localisation. Ainsi, les astrocytes de la moelle épinière auront une identité moléculaire distincte selon qu'ils sont ventraux ou dorsaux (A. V. Molofsky et al., 2014). De plus, il a été montré que la maturation des astrocytes s'effectue parallèlement à la synaptogénèse, notamment via des interactions protéiques (neuroligines astrocytaires et neurexines neuronales), indiquant une communication entre la synapse et l'astrocytes dès leur développement (Stogsdill et al., 2017).

Ainsi, la formation et maturation des astrocytes dépendent de leur positionnement, leur environnement et leur communication avec les cellules environnantes, notamment les neurones.

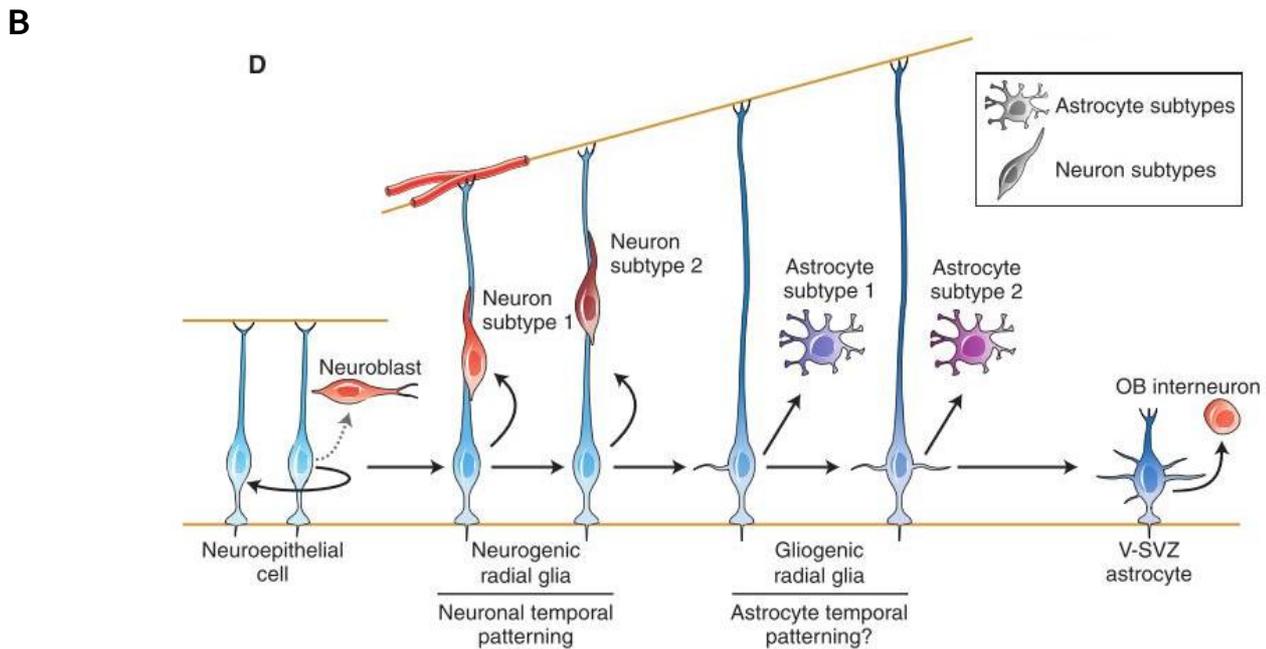
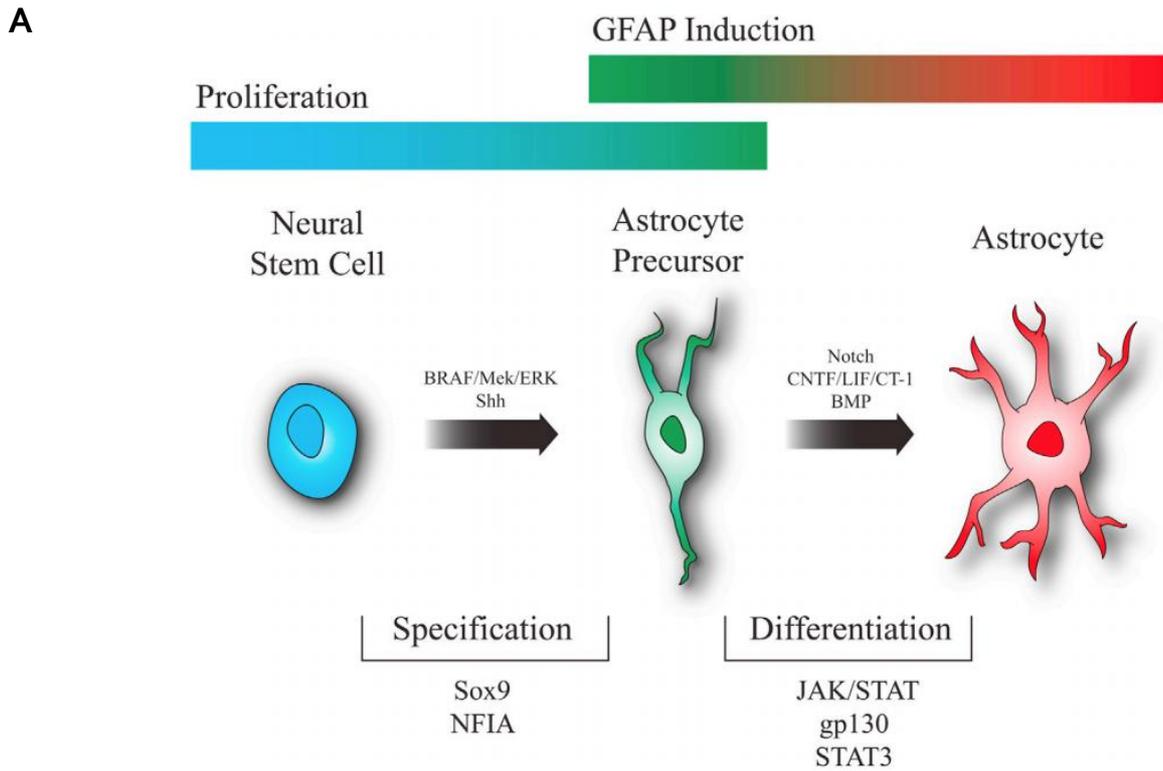


Figure 2 : Développement des astrocytes. A. Schéma des processus moléculaires et cellulaires impliqués dans l'astrogénèse. *de Gallo & Deneen, 2014.* B. Progression des cellules souches neurales durant le développement. Les cellules neuroépithéliales donnent naissance à des glies radiaires qui génèrent différents sous-types neuraux de différentes manières, notamment des astrocytes. *Modifié à partir de Bayraktar, Fuentealba, Alvarez-Buylla, & Rowitch, 2015.*

1.2.3. Propriétés morphologiques

Chez le rongeur, on distingue deux classes d'astrocytes à la morphologie caractéristique (Oberheim et al., 2012). D'une part, les astrocytes dits « protoplasmiques » sont les plus abondants, ils sont présents dans la matière grise et leur morphologie étoilée est très caractéristique. Ce sont ceux les plus connus et étudiés dans cette étude. D'autre part, les astrocytes dits « fibreux » sont présents dans la matière blanche et ont des arborisations moins développées que celle des astrocytes protoplasmiques, avec des prolongements moins longs en moyenne (Oberheim et al., 2012 ; Kimmelberg, 2010). Notons que chez l'homme, on distingue deux classes supplémentaires d'astrocytes, les astrocytes interlaminaires présents dans la couche I du cortex, et les astrocytes à projections variqueuses, présents dans les couches V-VI du cortex (Vasile, Dossi et Rouach, 2017 ; Oberheim, 2009).

Pour étudier la morphologie astrocytaire, le marqueur GFAP a été largement utilisé mais l'est de moins en moins car il est maintenant convenu de manière assez consensuelle qu'il n'est pas le plus approprié, étant donné qu'il ne couvre que 15% du domaine de l'astrocyte (Bushong, Martone, Jones, & Ellisman, 2002). Les astrocytes protoplasmiques, ont une forme complexe et une arborescence développée, un diamètre d'environ 40-60µm et un volume d'environ $2-8.10^3 \mu\text{m}^3$. Un astrocyte peut être associé à 300-600 dendrites, contacter 100 000 synapses chez la souris et 2 millions chez l'Homme (Bushong et al., 2002; Halassa, Fellin, Takano, Dong, & Haydon, 2007; Oberheim, Wang, Goldman, & Nedergaard, 2006; Ogata & Kosaka, 2002). L'astrogénèse étant parallèle à la synaptogénèse, la complexité morphologique astrocytaire se développe et s'acquière en fonction de l'activité neuronale et synaptique environnante à l'astrocyte (Stogsdill et al., 2017).

Les astrocytes couvrent des domaines distincts, c'est-à-dire que leurs arborescences respectives ne se chevauchent pas (Figure 3) (Bushong et al., 2002). Les domaines astrocytaires varient de région en région, de par leur taille, le nombre et type de synapses qu'ils couvrent, et la distance entre les prolongements astrocytaires périphériques (PAP) et la synapse (Morel et al., 2014) (cf. partie 2.1 pour plus d'informations sur la couverture synaptique astrocytaire).

La morphologie astrocytaire diffère d'une région à l'autre (Olude et al., 2015). En effet, les astrocytes du cervelet vont être plus longilignes et possèdent de plus longs prolongements que ceux du cortex. De plus, la morphologie astrocytaire est un élément très plastique et change en fonction de modifications dans l'environnement. Il a notamment été montré que les niveaux d'expression de certains canaux ioniques étaient impliqués dans le gonflement des astrocytes (Lafrenaye & Simard, 2019). Il a aussi été montré que les concentrations en molécules de signalisation telles que le cAMP pouvaient induire une augmentation de la taille des prolongements astrocytaires (Ramakers & Moolenaar, 1998). Ou encore, nous savons que les concentrations en protéines du cytosquelette pouvaient induire une modification morphologiques astrocytaire, notamment dans le cas d'une blessure du système nerveux (cf. Introduction Chapitre I, partie 5) (Hol & Pekny, 2015).

1.2.4. Canaux ioniques, récepteurs et transporteurs

-Canaux ioniques

Les canaux ioniques présents à la membrane astrocytaire peuvent être perméables aux ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} (Alexej Verkhratsky & Steinhäuser, 2000). Le plus abondant des canaux ioniques astrocytaires est le canal potassique $K_{ir4.1}$, particulièrement exprimé dans les PAPs et dans les pieds astrocytaires (Olsen, 2012). Notons que l'expression de ce canal augmente au cours du développement et s'accompagne d'une transition d'expression du soma vers les prolongements (Moroni, Inverardi, Regondi, Pennacchio, & Frassoni, 2015; Seifert et al., 2009). D'autres canaux potassiques sont aussi présents (voir table 1) mais à de moindres niveaux. Les canaux sodiques appartiennent à la famille des Na_v (canaux sodiques dépendants du voltage), le plus abondant étant le $Na_v1.5$ (Kressin, Kuprijanova, Jabs, Seifert, & Steinhäuser, 1995) mais les mécanismes précis de ces canaux dans les astrocytes sont encore méconnus. Les canaux calciques Ca_v (canaux calciques dépendants du voltage) ont été détectés dans les transcriptomes de rongeurs (Ye Zhang et al., 2014), mais leur présence *in vivo* est encore controversée, car non détectée (Carmignoto, Pasti, & Pozzan, 1998). D'autres canaux peuvent transporter du Ca^{2+} dans certaines conditions, comme le complexe Orai/STIM1, activé par des augmentations transitoires de Ca^{2+} intracellulaire (Kraft, 2015), ainsi que le canal «transient receptor potential» (TRP) impliqué dans la reconstitution du Ca^{2+} intracellulaire et dans la coordination de la signalisation au sein de l'astrocyte (Alexei Verkhratsky, Reyes, & Parpura, 2014). Notons que d'autres canaux sont exprimés dans les astrocytes, comme l'aquaporine 4, canal perméable à l'eau, et des connexines (Cx). Ces dernières feront l'objet de la partie 3.

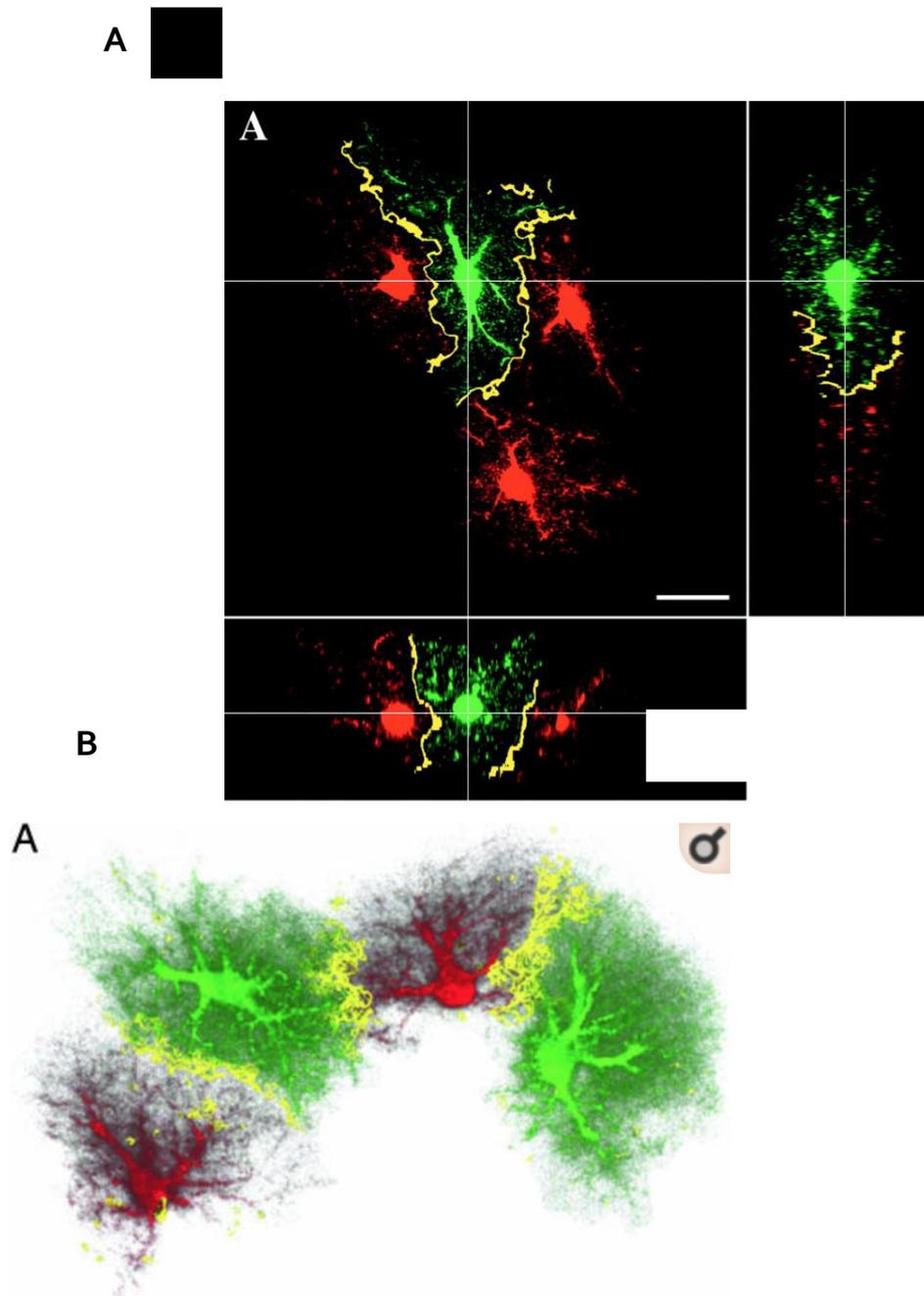


Figure 3 : Délimitation des domaines astrocytaires. A. Dialyse d'astrocytes avec un fluorophore révélant le faible chevauchement des prolongements astrocytaires voisins comme i indiqué en jaune. Représentation en X-Y (large image), Y-Z (image de droite) et Y-Z (image du bas), barre de calibration : 20 μm . *Modifié à partir de Bushong et al., 2002.* B. Reconstruction 3D d'astrocytes voisins, avec le chevauchement des prolongements marqués en jaune. *Modifié d'après Wilhelmsson et al., 2006.*

| Channel | Family | Subfamily | Function |
|-----------------|--|--|--|
| K ⁺ | Inward rectifier potassium channels | K _{ir} 4.1 (predominant) K _{ir} 2.1, 2.2, 2.3 K _{ir} 3.1 K _{ir(ATP)} 6.1, 6.2 | Buffering extracellular potassium. Maintaining membrane resting potential |
| | 2-pore domain K ⁺ channels | TWIK-1/TREK-1 | K ⁺ leak channels |
| | voltage-gated (K _v) | K _A (K _{v4.x}) K _v 1.5 K _v 1.6 | Unknown |
| | Ca ⁺ -dependent K ⁺ channels | K _{Ca} (SK-3) K _{v(Ca)} (BK) | Unknown |
| Ca ⁺ | Voltage-gated (Cav) | Ca _v 1.2,1.3 ; Ca _v 2.2,2.3; Ca _v 3.1,3.2 T- and L-type N- and R-type | Unknown |
| Na ⁺ | Voltage-gated (Nav) | Na _v 1.2,1.3 (TTX-S) NaG (TTX-R) | Unknown |
| TRPV | Transient Receptor Potential Channel | TRPV ₄ | Possibly involved in volume regulation |
| CIC CAAC | Chloride/Anion Channels | CIC-2 (CIC-3) Bestrophin1 (CAAC) | Chloride transport, volume regulation |
| AQP | Aquaporins (water channels) | AQP ₄ (predominant) AQP3-5, AQP8, AQP9 | Water transport, volume regulation |
| Cx/Px | Connexin/Pannexin | Cx26, Cx30, Cx43 Panx-1 | Gap-junction, hemichannels and others |

Tableau 1 : Canaux ioniques astrocytaires
Modifié à partir de Christensen, Petersen, & Perrier, 2013.

- Récepteurs

Les récepteurs permettent aux astrocytes de détecter une grande variété de molécules, telles que les neurotransmetteurs, les métabolites, les acides aminés et les neuropeptides libérés par les cellules voisines. Les astrocytes sont notamment très bien équipés pour répondre à la présence d'ATP sous toutes ses formes, grâce à l'expression des récepteurs purinergiques ionotropiques et métabotropiques (P2X et P2Y, respectivement)

et des quatre sous-types de récepteurs à l'adénosine couplés à une protéine G (Daré, Schulte, Karovic, Hammarberg, & Fredholm, 2007). Leur stimulation induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Peakman & Hill, 1995; Porter & McCarthy, 1995).

Les récepteurs au glutamate, essentiellement métabotropiques (mGluRs) et parfois ionotropiques (AMPA et NMDA) ont été détectés dans les astrocytes. Les récepteurs AMPA astrocytaires ont été détectés mais uniquement dans la glie de Bergmann, du cervelet (Millán, Arias-Montaña, Méndez, Hernández-Kelly, & Ortega, 2004). De même, les récepteurs NMDA ont été détectés dans les astrocytes du néocortex (Schipke et al., 2001; Skowrońska, Obara-Michlewska, Zielińska, & Albrecht, 2019) et des courants NMDA astrocytaires ont été enregistrés (Palygin, Lalo, Verkhatsky, & Pankratov, 2010). Cependant, la fonctionnalité de ces récepteurs dans les astrocytes reste débattue. En revanche, le récepteur métabotrope au glutamate mGluR5 est fortement exprimé par les astrocytes immatures, mais décroît au cours du temps et seul de très faibles niveaux d'expression sont observés à l'âge adulte (Cai, Schools, & Kimelberg, 2000; Sun et al., 2013). Il semblerait donc que son rôle soit principalement développemental pour les astrocytes (Morel et al., 2014). Leur activation induit une augmentation du Ca^{2+} astrocytaire et stimule la capture de glutamate par les astrocytes. Ainsi, les récepteurs mGluR5 astrocytaires sont des éléments clés de la communication neurogliale de la synapse tripartite, en tant que senseurs et modulateurs de la transmission glutamatergique (A. Panatier & Robitaille, 2016; Umpierre, West, White, & Wilcox, 2019).

Les astrocytes expriment aussi des récepteurs au GABA et à la glycine. Le récepteur GABA_A a notamment été identifié, et son activation induit une entrée de Ca^{2+} via des canaux calciques voltage-dépendants (VGCCs) dans les astrocytes (MacVicar, Tse, Crichton, & Kettenmann, 1989; Meier, Kafitz, & Rose, 2008; Muller et al., 1994). Dans l'hippocampe, tous les isotopes du récepteur GABA_B ont été détectés (GABA_{B1a}, GABA_{B1b}, GABA_{B2}) et se regroupent dans les PAPs (Charles, Calver, Jourdain, & Pangalos, 2003). Leur activation induit un relargage de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique accompagné d'oscillations Ca^{2+} (Losi, Mariotti, & Carmignoto, 2014; Meier et al., 2008).

Enfin, d'autres récepteurs ont été détectés, notamment ceux à la noradrénaline (F. Ding et al., 2013), la dopamine (Jennings et al., 2017), l'acétylcholine (Sadigh-Eteghad, Majidi, Mahmoudi, Golzari, & Talebi, 2016), l'histamine (Jurič, Kržan, & Lipnik-Stangelj, 2016), aux cannabinoïdes (Stella, 2010) et aux neuropeptides comme l'ocytocine, la vasopressine, la somatostatine ou encore l'endothéline (Deschepper, 1998).

Il est intéressant de noter que l'activation des récepteurs astrocytaires induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. En revanche, celle-ci n'aura pas les mêmes conséquences, selon quel récepteur est activé (cf. partie I.4. de l'Introduction).

-Transporteurs

Les astrocytes possèdent un grand nombre de transporteurs, ce qui atteste de leur rôle dans la régulation et l'homéostasie extracellulaire. Ils expriment les transporteurs au glutamate EAAT1 et EAAT2 (excitatory amino acid transporters), aussi nommés GLAST pour GLutamate ASpartate Transporter 1, et GLT1 pour GLutamate Transporter 1 respectivement. Le EAAT1 étant plus exprimé dans la glie de Bergmann (glie cérébelleuse) et le EAAT2 prédominant dans les autres régions (Vandenberg & Ryan, 2013). Le glutamate peut aussi être transporté via l'échangeur Cystéine-Glutamate (xCT) (Ottestad-Hansen et al., 2018). Pour ce qui est du transport du GABA et de la glycine, celui-ci est principalement sous-tendu par les transporteurs GAT3 et le Glyt1 (Gomez, Zafra, Olivares, Giménez, &

Aragón, 1995; Minelli, DeBiasi, Brecha, Zuccarello, & Conti, 1996). Ces transporteurs étant principalement localisés dans les PAPs, ils ont un rôle majeur dans les fonctions astrocytaires à la synapse, plus amplement discutées dans les parties 2.2 et 2.3.

Enfin, des transports de molécules peuvent aussi être réalisés par des pompes ATP-dépendantes telles que la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase ou la Ca^{2+} -ATPase, en fonction de leur gradient de concentration (Capuani et al., 2016; Fresu, Dehpour, Genazzani, Carafoli, & Guerini, 1999).

1.3. Fonctions

1.3.1. Rôle dans la synaptogénèse et l'élagage synaptique

Lors du développement du cerveau, il a été observé que la période de synaptogénèse correspondait aussi à celle de la maturation des astrocytes (Miller & Gauthier, 2007). Plusieurs molécules libérées par les astrocytes et importantes pour la synaptogénèse ont été découvertes, telles que le facteur de croissance transformant β_1 (Transforming growth factor, TGF- β_1), la thrombospondin₁ et la protéine sécrétée acide et riche en cystéine (SPARC, nommée aussi ostéonectine) (Allen et al., 2012; Christopherson et al., 2005; Diniz et al., 2012; Gómez-Casati et al., 2010). Les thrombospondines 1 et 2 (TSP-1 et TSP-2) sont exprimées lors des premières semaines postnatales et aident au développement des synapses excitatrices via leur liaison aux intégrines, aux neuroligines et à la sous-unité $\alpha_2\delta-1$ du canal Ca^{2+} , ce qui aura pour effet de recruter des protéines d'échafaudage. Ensuite, les interactions entre présynapse et postsynapse sont facilitées par SPARC, une protéine acide enrichie en cystéine libérée par les astrocytes (Kucukdereli et al., 2011). La spécialisation synaptique est aussi établie à l'aide du TGF- β_1 qui aide à l'insertion de récepteurs de type AMPA et NMDA à la synapse (Bae et al., 2011).

De plus, la TGF- β_3 sécrété par les astrocytes promeut l'expression de molécules du complément agissant comme « marquage » des synapses en excès, qui seront ensuite élaguées (Bialas & Stevens, 2013; Stevens et al., 2007). Les astrocytes sécrètent aussi les multiple epidermal growth-like domains 10 (MEGF10) et c-Mer tyrosine kinase receptor (MERTK), qui facilitent l'élagage synaptique (Chung et al., 2013).

Ainsi, les astrocytes sont des acteurs de la spécialisation et de raffinement synaptique lors du développement.

1.3.2. La barrière hématoencéphalique

En plus de contacter les synapses, les astrocytes étendent leurs prolongements jusqu'aux vaisseaux sanguins. La barrière hématoencéphalique (blood brain barrier ou BBB) est grandement régulée par les astrocytes (Daneman & Prat, 2014). Les prolongements astrocytaires apposés aux vaisseaux, appelés pieds astrocytaires, expriment notamment un ensemble de protéines localement traduites, permettant un maintien des fonctions d'homéostasie, de développement de la BBB et de la contractilité des vaisseaux (A. C. Boulay et al., 2017). De plus, les astrocytes sont des acteurs majeurs du couplage neurovasculaire et approvisionnent les neurones en glucose via leur interface gliovasculaire. Enfin, les astrocytes peuvent aussi réguler la perméabilité de la BBB, la réorganisation cellulaire et la sécrétion de signaux inflammatoires en conditions pathologiques.

1.3.3. Homéostasie ionique

Les astrocytes régulent l'homéostasie de plusieurs ions et molécules du cerveau. En premier lieu, il est crucial que la répartition de l'eau dans le cerveau soit équilibrée, car l'excès d'eau dans le cerveau peut altérer les fonctions neuronales (Potokar, Jorgačevski, & Zorec, 2016). Comme la glycolyse génère six molécules d'eau, il est important d'avoir un système de recyclage aqueux. Les astrocytes endossent cette fonction grâce à leur faculté à changer rapidement de volume et à leur forte expression d'aquaporine-4 (AQP₄), un canal perméable à l'eau, particulièrement enrichi dans les pieds astrocytaires et dans les PAPs (Nielsen et al., 1997).

Afin de préserver une activité neuronale physiologique, l'homéostasie ionique doit être préservée, en particulier pour les ions potassiques K⁺. En effet, un potentiel d'action augmente la concentration extracellulaire d'ions K⁺ (Adelman & Fitzhugh, 1975). Les astrocytes constituent le mécanisme principal de régulation des ions K⁺ du cerveau, à l'aide notamment de leurs canaux K⁺ à rectification entrante, les K_{ir}4.1, fortement activés en présence d'activité synaptique (Nwaobi, Cuddapah, Patterson, Randolph, & Olsen, 2016). D'autres transporteurs astrocytaires comme NKCC1 ou la pompe Na⁺/K⁺ ATPase semblent aussi participer à la capture du K⁺ excédentaire (Ransom, Ransom, & Sontheimer, 2000).

Les astrocytes sont aussi des régulateurs de pH. En effet, ils peuvent procéder à la capture d'ions H⁺ en même temps que celle du glutamate à l'aide de transporteurs de type EAAT, tout en libérant des ions basiques HCO₃⁻ au moyen du transporteur Na⁺/HCO₃⁻ (Rose & Ransom, 1996).

1.3.4. Recyclage et synthèse de neurotransmetteurs

Au travers de la variété de transporteurs exprimés par les astrocytes (cf. 1.2.4.), ceux-ci procèdent à la capture de beaucoup de différents neurotransmetteurs à la synapse. Ainsi, ils permettent notamment la capture de glutamate grâce à leurs transporteurs GLT1 et GLAST, de GABA via les GAT1 et GAT3 (Boddum et al., 2016; Borden & Caplan, 1996) et d'adénosine via le transporteur d'équilibration ENT-1/SLC29A1-4, et le transporteur de nucléotides CNT2/SLC28A2-3 (King, Ackley, Cass, Young, & Baldwin, 2006). Enfin, les monoamines tels que la dopamine, sérotonine et noradrénaline sont aussi transportées par les astrocytes (Quesseveur, Gardier, & Guiard, 2013).

A partir du glucose contenu dans le sang, les astrocytes synthétisent des neurotransmetteurs majeurs tels que le GABA et le glutamate que les neurones ne peuvent produire (Hertz, Dringen, Schousboe, & Robinson, 1999; Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979; Öz et al., 2004). Ainsi, la neurotransmission est dépendante de l'activité astrocytaire.

2. LA SYNAPSE TRIPARTITE

2.1. La couverture synaptique

La couverture physique d'un astrocyte à la synapse est une donnée très variable. Tout d'abord, elle varie en fonction de la région du cerveau. En effet, environ 94% des synapses cérébelleuses sont recouvertes par un astrocyte (Xu-Friedman & Regehr, 2003), 60% des synapses hippocampiques dans l'aire CA1 (Ventura & Harris, 1999), 30% des synapses néocorticales (Špaček, 1985) et aucune dans le compartiment sensoriel central du glomérule olfactif (Chao, Kasa, & Wolff, 1997). Par ailleurs, cette couverture astrocytaire à la synapse est régulée par les facteurs environnementaux tels que la stimulation sensorielle dans le cas des vibrisses d'un rongeur (Genoud et al., 2006), la lactation comme décrit dans le noyau supraoptique (SON) (Bobak & Salm, 1996; Hawrylak, Fleming, & Salm, 1998) ou l'enrichissement comportemental (Jones & Greenough, 1996) et la plasticité synaptique (Wenzel, Lammert, Meyer, & Krug, 1991).

Cette couverture synaptique astrocytaire place les astrocytes en position d'acteurs majeurs à la synapse. En effet, des études ont lié l'efficacité de capture du glutamate, par le transporteur astrocytaire GLT-1, à la proximité physique de l'astrocyte à la synapse (Oliet, Piet, & Poulain, 2001; Omrani et al., 2009; Pannasch et al., 2014). De plus, la couverture synaptique des synapses excitatrices permettrait de rapprocher les vésicules astrocytaires contenant du glutamate pour activer les récepteurs glutamatergiques pré- et post-synaptiques (Parpura & Zorec, 2010). Ainsi, la transmission synaptique et la gliotransmission sont des phénomènes dont l'efficacité dépend de la couverture synaptique astrocytaire.

2.2. Les fonctions astrocytaires à la synapse – la gliotransmission

Lors de la découverte de la synapse tripartite, l'hypothèse était émise que les événements Ca^{2+} astrocytaires, générés par la transmission synaptique, étaient à l'origine du relargage de substances neuroactives telles que le glutamate, la D-sérine ou l'ATP (Araque et al., 1999). Le concept de gliotransmission était né. Cette théorie a été renforcée par la découverte de nouveaux concepts depuis.

Les mécanismes par lesquels les astrocytes peuvent libérer des molécules neuroactives sont multiples (Figure 4). Tout d'abord, via des canaux ou transporteurs activés par le Ca^{2+} intracellulaire : leurs propriétés ont montré que les astrocytes pouvaient répondre de manière locale, transitoire et adaptée à une activité neuronale (cf. partie 4). Ensuite, il a été montré que ces signaux Ca^{2+} peuvent induire le relargage de molécules par exocytose. Ce processus est dépendant de molécules nommées SNARE (Soluble Nsf Attachment Protein Receptor), et il a été montré que les astrocytes expriment les molécules clés de cette machinerie, telles que la synaptobrevin II et SNAP 23 (Hepp et al., 1999; Parpura, Fang, Basarsky, Jahn, & Haydon, 1995). En plus des SNARE, nécessaires pour la fusion membranaire sous-jacente à une exocytose, les astrocytes possèdent aussi des petits compartiments sécrétoires appelés SLMV (Synaptic-Like MicroVesicles). Il a été montré que

ces SLMV astrocytaires, localisés dans les PAPs, pouvaient exprimer des transporteurs tels que VGLUT1-3, les rendant susceptibles à contenir du glutamate ou de la D-sérine (Bezzi et al., 2004; Montana, Ni, Sunjara, Hua, & Parpura, 2004; Ormel, Stensrud, Bergersen, & Gundersen, 2012; Ormel, Stensrud, Chaudhry, & Gundersen, 2012). En plus d'exprimer les éléments nécessaires à de l'exocytose, une sécrétion vésiculaire astrocytaire a été observée *in vitro* (Bowser & Khakh, 2007). *In vivo*, la génération d'une souris déficiente en synaptobrevin II de manière inductible a permis d'élucider des mécanismes d'exocytose astrocytaire contrôlant la signalisation purinergique astrocytaire (Pascual et al., 2005).

Par ailleurs, il est tout de même important de noter que ce concept de gliotransmission a éveillé la critique. Le but n'étant pas ici de refaire le débat, retenons simplement qu'il est possible que la concentration de neurotransmetteurs contenue dans une vésicule astrocytaire soit trop faible pour avoir un effet synaptique similaire à celui évoqué par une transmission neuronale (Bramham, Torp, Zhang, Storm-Mathisen, & Ottersen, 1990; Freche, Pannasch, Rouach, & Holcman, 2011; Hamilton & Attwell, 2010). Cette dernière étude en particulier a montré l'importance de la géométrie de la synapse et de la couverture synaptique astrocytaire sur les effets de la gliotransmission.

En plus de la sécrétion de molécules par exocytose, les astrocytes sont dotés de multiples canaux et transporteurs leur permettant de libérer des molécules neuroactives (Figure 4). Il a été observé, notamment en conditions inflammatoire ou hypoxique, que les hémicanaux de connexines ou pannexines peuvent s'ouvrir et libérer de l'ATP (Bennett et al., 2012; Orellana et al., 2010). De plus, en situation d'ischémie, il a aussi été montré que les transporteurs astrocytaires au glutamate (EAAT1/2) peuvent avoir une action inversée et libérer du glutamate (Grewer et al., 2008; Nicholls & Attwell, 1990; Woo et al., 2012).

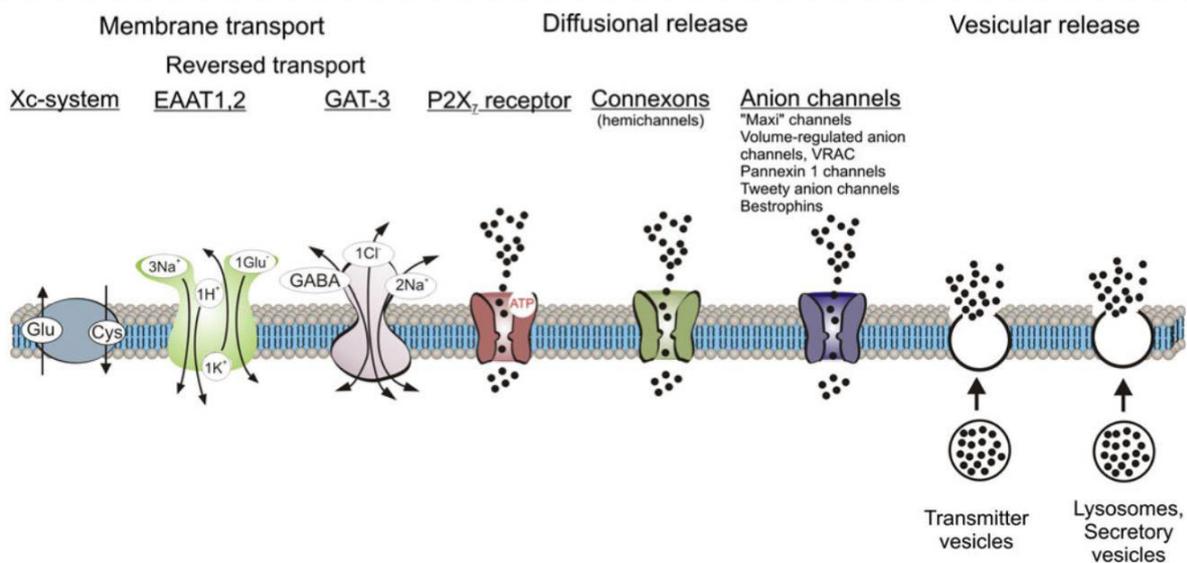


Figure 4 : Mécanismes de libération de gliotransmetteurs. Les astrocytes peuvent libérer des molécules neuroactives par divers moyens, un transport membranaire actif par des échangeurs ou des pompes, un transport passif via des canaux fonctionnant par gradient de concentration, ou par relarguage vésiculaire. *Extrait de Alexei Verkhratsky, Rodríguez, & Parpura, 2012.*

2.3. La capture du glutamate

La capture du glutamate extracellulaire est primordial car le glutamate, bien qu'il soit le neurotransmetteur excitateur principal du cerveau, est toxique pour les neurones à forte dose, un processus appelé excitotoxicité (Jia, Njapo, Rastogi, & Hedna, 2015; Zhou & Danbolt, 2014)

Les astrocytes expriment fortement à leur membrane les transporteurs GLAST et GLT₁ qui seraient responsables d'environ 80% de la capture glutamatergique (Danbolt, 2001). Le glutamate excédent peut diffuser au-delà de la fente synaptique, un processus appelé « débordement » (spillover), et peut activer des récepteurs métabotropiques neuronaux, ce qui affecterait la réponse post-synaptique (Murphy-Royal et al., 2015). A l'inverse, l'échangeur cystéine/glutamate xCT astrocytaire peut libérer du glutamate pour en réguler sa concentration extracellulaire (Massie et al., 2011).

Le glutamate capturé est ensuite synthétisé en glutamine via l'enzyme glutamine synthétase présente dans les PAPs. Ensuite, la glutamine nouvellement formée est libérée par les transporteurs système N (SystN) et capturée par les transporteurs système A (SystA) neuronaux. La reconversion en glutamate a ensuite lieu dans la terminaison présynaptique à l'aide de la glutaminase. Ce processus est nommé le cycle glutamate-glutamine (Waniewski & Martin, 1986). Il a récemment été montré que ce processus était dépendant de l'activité synaptique. En effet, l'activation de GLT₁ et la capture de glutamate est accompagnée d'une entrée d'ions Na⁺ qui à leur tour stimulent la libération de glutamine (Todd, Marx, Hulme, Bröer, & Billups, 2017). Il a d'ailleurs été montré que bloquer le cycle glutamate-glutamine inhibe l'activité synaptique glutamatergique (Barnett & Pow, 2000).

3. LES CONNEXINES ASTROCYTAIRES

Les astrocytes sont organisés en réseau, échangeant à travers des jonctions communicantes, formées par des protéines nommées connexines (Cxs) (Escartin & Rouach, 2013; Sofroniew & Vinters, 2010). Nous allons ici discuter des Cxs, de leurs propriétés et fonctions, notamment à la synapse.

3.1. Les propriétés de connexines astrocytaires

3.1.1. Généralités sur les connexines astrocytaires

Les Cxs sont des protéines formant des canaux membranaires, elles font partie d'une large famille de gènes, et sont nommées d'après leur poids moléculaire. Elles sont exprimées dans la plupart des tissus, avec une spécificité temporelle et cellulaire. La structure génomique est conservée évolutivement, mais leur expression peut être modulée par des facteurs de transcription et enzymes de régulation épigénétique spécifiques (Oyamada, Takebe, & Oyamada, 2013)

Les astrocytes expriment plusieurs Cxs, les Cx₄₃ et 30 principalement, et la Cx₂₆ bien que cette dernière ne semble pas être fonctionnelle (J. I. Nagy, Patel, Ochalski, & Stelmack, 1999; James I. Nagy et al., 2001; N Rouach et al., 2002). Une Cx est formée de quatre

régions hydrophobes transmembranaires avec deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire et des domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques (Figure 5) (Giaume, Leybaert, Naus, & Sáez, 2013; Grosely & Sorgen, 2013). Six Cxs s'assemblent de manière homomérique ou hétéromérique pour former une structure appelée connexon (Figure 5), qui peut exister seul en tant que canal transmembranaire nommé alors hémicanal, ou s'apposer à un autre connexon d'un astrocyte voisin et former une jonction communicante (Segretain & Falk, 2004). L'apposition entre deux connexons peut se faire entre connexons identiques, auquel cas on parle jonction homotypique, ou entre connexons différents, on parle alors de jonction hétérotypique, avec cependant un nombre restreint de combinaisons (Koval, 2006). Les jonctions communicantes hétérotypiques joueraient un rôle de valve dans la communication intercellulaire astrocytaire, dont la fonction est dépendante du voltage (Palacios-Prado & Bukauskas, 2009). Des expériences de couplage par marqueurs fluorescents ont montré que plus de 80% des cellules formant des jonctions communicantes fonctionnelles avec des astrocytes étaient des astrocytes voisins (Schools, Zhou, & Kimelberg, 2006). De plus, les astrocytes peuvent former des jonctions communicantes avec eux-mêmes, dites « autocellulaires », bien que leur fonction reste méconnue (Wolff et al., 1998).

Les Cxs ont une durée de vie relativement courte (quelques heures) et sont donc recyclés plusieurs fois par jour, permettant une rapide adaptation de leur expression à l'environnement (Hervé, Derangeon, Bahbouhi, Mesnil, & Sarrouilhe, 2007). La régulation de leur transcription est sous la responsabilité de facteurs de transcription spécifiques, notamment Wnt pour la Cx43, et NFκB pour la Cx30 (Ortolano et al., 2008; Van der Heyden et al., 1998).

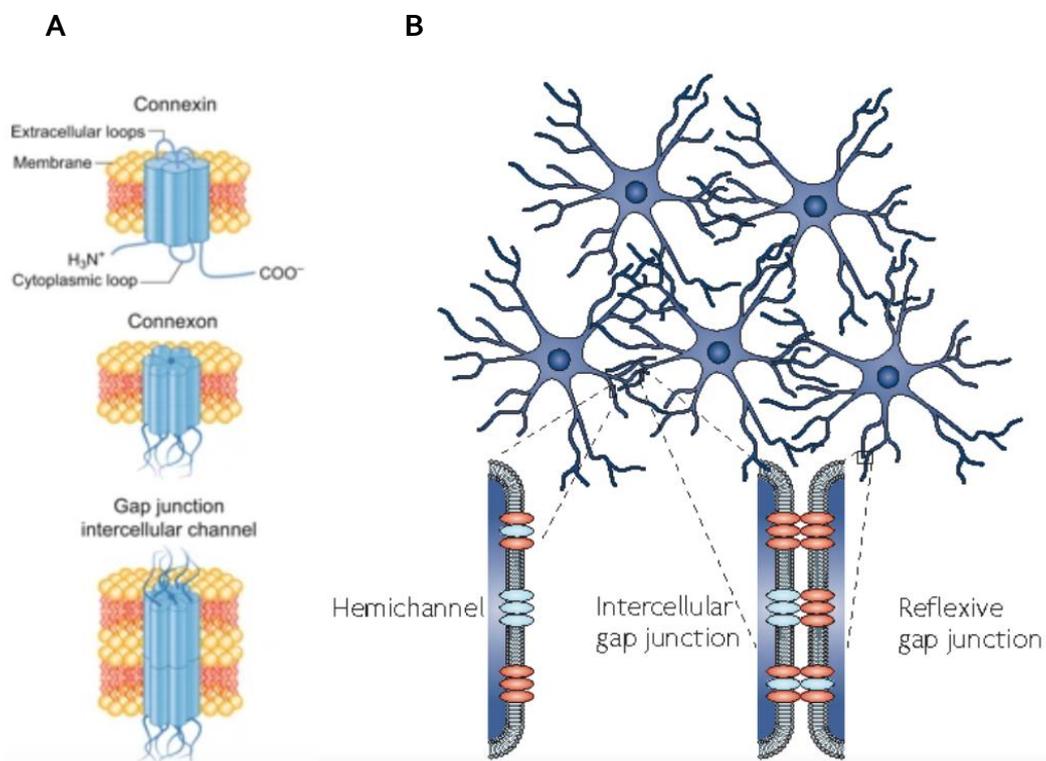


Figure 5 : Les connexines, siège de la communication intercellulaire astrocytaire. A. Schéma d'une Cx (composé des 4 domaines transmembranaires, de boucles cytoplasmiques et extracellulaire, et de domaines N- et C- terminaux intracellulaires), un

connexon (6 connexines), et d'une jonction communicante (2 connexons de cellules voisines apposés l'un à l'autre). *Adapté à partir de Aasen et al., 2019*. B. Schéma d'un réseau astrocytaire sous-tendu par les jonctions communicantes formées de jonctions homo- ou hétérotypiques, ainsi que d'hémicanaux formés de Cxs homo- ou hétéromériques, pour communiquer avec le milieu extracellulaire. *Adapté de Giaume, Koulakoff, Roux, Holcman, & Rouach, 2010*.

3.1.2. Modulation du réseau astrocytaire

Le réseau astrocytaire, sous-tendu par les Cxs, est modulé par des molécules extracellulaires libérées par les cellules voisines, sur le court-terme comme sur le long-terme. En effet, les changements d'état physiologique des astrocytes, le pH intracellulaire, la capacitance membranaire et l'osmolarité notamment, modulent l'étendue du réseau astrocytaire (N Rouach et al., 2002). Les modifications à court-terme de l'étendue du réseau dépendent des cinétiques d'ouverture et de conductance des Cxs, elles-mêmes gouvernées par l'action de molécules extracellulaires telles que l'ATP et le Ca^{2+} sur des voies de signalisation intracellulaires et sur l'expression d'enzymes spécifiques (des kinases et des phosphatases) (Goodenough & Paul, 2009; Moreno & Lau, 2007). Ainsi, l'adaptation des Cxs astrocytaires à leur environnement fait du réseau astrocytaire un élément relativement plastique. Les Cxs existent principalement sous leur forme phosphorylée, et cette phosphorylation semble globalement sous-tendre leur fonction de protéine-canal. En effet, lorsqu'elles sont déphosphorylées, les Cxs sous-tendent des réductions de communication intercellulaire (Guan, Wilson, Schlender, & Ruch, 1996; Manthey et al., 2001; Moreno & Lau, 2007; Ponsaerts et al., 2010).

Les états physiologiques astrocytaires modifient aussi l'ouverture des canaux, comme par exemple l'acidification de leur milieu intracellulaire, qui est responsable du découplage des connexons (Francis et al., 1999). De plus, la sensibilité des jonctions communicantes au voltage est un autre facteur de modification du réseau, une dépolarisation induisant l'ouverture des canaux, tandis qu'une hyperpolarisation provoque leur fermeture (Cheung, Chever, Rouach, & Orellana, 2014; De Pina-Benabou, Srinivas, Spray, & Scemes, 2001; Kristian Enkvist & McCarthy, 1994). En conclusion, les Cxs sont sensibles aux signaux chimiques de leur environnement, et sont le siège des fonctions du réseau astrocytaire.

3.1.3. Différences entre Cx30 et Cx43

Il est important de noter que les Cx30 et Cx43 ont des fonctions distinctes au sein de l'astrocyte. Leur expression ne débute pas au même stade développemental : tandis que la Cx43 s'exprime dès le développement embryonnaire, la Cx30 est détectable plus tardivement, à partir de la 2^{ème} semaine postnatale (Kunzelmann et al., 1999). Cette différence d'expression dans le temps reflète notamment la différence qu'il existe dans les fonctions respectives de la Cx43 et de la Cx30. En effet, il a été montré que la Cx43 est promotrice de survie et prolifération neuronale dans l'hippocampe, tandis que la Cx30 est plutôt responsable de la maturation postnatale des astrocytes, et régule notamment leur polarité (Ghézali et al., 2018; Liebmann, Stahr, Guenther, Witte, & Frahm, 2013; J. Zhang et al., 2018). De plus, les Cx30 et Cx43 ont un profil d'expression qui varie en fonction de l'aire cérébrale; la Cx30 est enrichie dans les aires sous-corticales et n'est pas exprimée dans la

matière blanche, tandis que la Cx43 est principalement détectée dans le cortex (J. I. Nagy et al., 1999).

Nous allons maintenant nous intéresser à la régulation de la neurotransmission par les Cxs astrocytaires.

3.2. Rôle des connexines astrocytaires dans la neurotransmission

3.2.1. Lien entre réseau astrocytaire et réseau neuronal

Comme nous venons de le décrire, les activités de réseau astrocytaire sont dépendantes de l'activité des Cxs. De plus, il a été montré que les réseaux astrocytaires englobent des zones où les activités de neurones sont synchronisées. En effet, l'expérience de dialyse d'un astrocyte par un fluorophore perméable aux jonctions communicantes permet de visualiser l'étendue de ce réseau. Il a été montré, dans les glomérules olfactifs et le cortex somatosensoriel notamment, que les astrocytes joints par des jonctions communicantes formaient un réseau de même étendue que l'unité fonctionnelle neuronale (Houades, Koulakoff, Ezan, Seif, & Giaume, 2008; Roux, Benchenane, Rothstein, Bonvento, & Giaume, 2011). En plus de la similarité topographique, une similarité fonctionnelle des réseaux neuronaux et astrocytaires concomitants a pu être établie. En effet, dans le cortex somatosensoriel, à l'aide de l'imagerie Ca^{2+} *in vivo* biphotonique, il a été établi que la signalisation Ca^{2+} astrocytaire faisait écho, de manière locale, à la signalisation électrique neuronale (Schummers, Yu, & Sur, 2008).

Grâce à leur perméabilité aux petites molécules, les Cxs peuvent aussi soutenir l'activité neuronale par leur capacité de trafic moléculaire au sein du réseau astrocytaire. Notamment, le transport de glucose au sein du réseau astrocytaire est nécessaire au bon approvisionnement énergétique des neurones environnants, et donc à la neurotransmission (Nathalie Rouach, Koulakoff, Abudara, Willecke, & Giaume, 2008). Enfin, notons que la contribution des Cxs à la transmission neuronale via des fonctions de jonctions communicantes est illustrée par les déficits comportementaux des souris déficientes en Cx43 et Cx30. En effet, ces souris exhibent de moins bonnes performances que les souris sauvages dans des tâches de mémoire spatiale (Lutz et al., 2009).

3.2.2. Fonctions hémicanal et neurotransmission

La fonction hémicanal des Cxs astrocytaires est assez récente dans le paysage de la recherche. Historiquement, les hémicanaux étaient considérés comme des canaux astrocytaires qui s'ouvraient uniquement en conditions pathologiques pour libérer du glutamate ou de l'ATP (Orellana et al., 2010; B. Ye et al., 2015; Z. C. Ye, Wyeth, Baltan-Tekkok, & Ransom, 2003). Plus récemment, il a été rapporté que ces hémicanaux astrocytaires avaient une activité et un rôle en conditions physiologiques (Cheung et al., 2014; Chever, Lee, & Rouach, 2014; Roux et al., 2011; Stehberg et al., 2012)

Il est important de noter que les hémicanaux sont perméables à des molécules plus grandes que celles qui passent à travers les jonctions communicantes et peuvent libérer des molécules telles que l'ATP, le glutamate et le glutathion (Giaume et al., 2013; Loewenstein, 1981; N. Wang et al., 2013). De plus, une étude récente a montré que les hémicanaux formés par les Cx43 étaient particulièrement perméable à l'ATP tandis que ceux formés de Cx30 ne montraient pas de sélectivité (Hansen, Braunstein, Nielsen, & Macaulay, 2014). Ainsi, les

hémicanaux astrocytaires, de par leur capacité à libérer diverses molécules, ont un rôle important dans la glio- et neurotransmission. En effet, en conditions physiologiques, les hémicanaux de Cx43 sont ouverts et régulent la transmission synaptique via une libération tonique d'ATP (Chever et al., 2014). Depuis, l'activité des hémicanaux et leur capacité à libérer des molécules de signalisation ont été étudiées, et la revue en annexe (particulièrement la figure 2) permettra une meilleure compréhension des différents mécanismes par lesquels les hémicanaux régulent la transmission synaptique. Rapidement, il a été montré que l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire induit par l'activation de récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR5) et à l'ATP (P2YR), engendre une ouverture des hémicanaux de Cx43. Ceux-ci libèrent ensuite des molécules telles que l'ATP, la D-sérine et le glutamate qui modulent la transmission synaptique (Abudara et al., 2015; Chever et al., 2014; Meunier et al., 2017; Z. C. Ye et al., 2003).

3.2.3. Les fonctions non-canal et leur rôle dans la transmission neuronale

La notion de fonctions non-canal, ou fonctions canal-indépendantes, fait référence à la signalisation intracellulaire induite par les Cxs, modifiant ainsi des propriétés astrocytaires, aux fonctions des Cxs liées à l'adhésion, la signalisation cellulaire et aux interactions protéiques. Ainsi, ces fonctions, bien que nommées différemment à l'époque, ont été liées au développement cérébral et à des caractéristiques telles que la migration et la différenciation neuronale (Elias, Turmaine, Parnavelas, & Kriegstein, 2010).

En revanche, en ce qui concerne la neurotransmission, une seule étude, récemment conduite au sein du laboratoire, a lié les fonctions non-canal de la Cx30 à l'activité synaptique (Pannasch et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la Cx30 gouvernait des changements morphologiques astrocytaires, ce qui avait un effet direct sur la plasticité glutamatergique hippocampique. En effet, les astrocytes déficients en Cx30 possèdent des prolongements plus grands, capables de pénétrer la fente synaptique (Figure 6), induisant ainsi une augmentation de capture du glutamate, mesurée par des courants astrocytaires GLT-1 plus forts en l'absence de Cx30. L'augmentation de la capture glutamatergique induit une diminution de la transmission synaptique, ce qui empêche notamment la mise en place d'une LTP dans l'hippocampe. Enfin, les auteurs ont montré que ces effets étaient sous-tendus par des fonctions canal-indépendantes de la Cx30, car bloquer les canaux ne modifiait pas la transmission synaptique. Ces fonctions canal-indépendantes ont été liées aux changements morphologiques et à l'insertion des PAPs dans la fente synaptique (Pannasch et al., 2014).

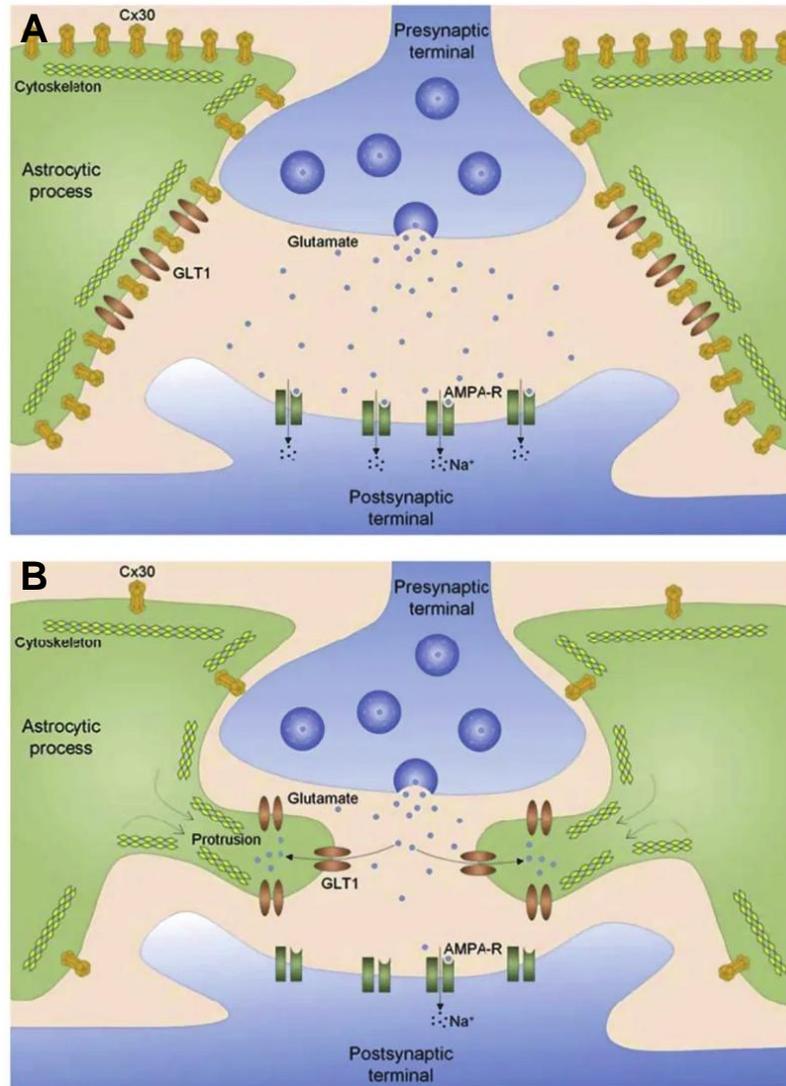


Figure 6 : La connexine 30 astrocytaire contrôle l'invasion synaptique des PAPs. A. En présence de Cx30, les prolongements pérисynaptiques astrocytaires se tiennent à proximité de la fente synaptique. B. En absence de Cx30, ces prolongements s'infiltrent dans la fente synaptique, permettant notamment une meilleure capture du glutamate. *D'après Clasadonte & Haydon, 2014.*

4. LE CALCIUM ASTROCYTAIRE

4.1. Propriétés

Le Ca^{2+} est le messager principal de la communication astrocytaire. Le Ca^{2+} intracellulaire astrocytaire est présent en conditions basales (Kuchibhotla, Lattarulo, Hyman, & Bacskai, 2009; Shigetomi, Kracun, Sofroniew, & Khakh, 2010) à des concentrations plus élevées que celles détectées dans les neurones (Zheng et al., 2015). De plus, il semble être plus présent dans les prolongements astrocytaires que dans le soma. Il a même été noté que tous les astrocytes n'ont pas la même concentration calcique basale. En plus de l'hétérogénéité spatiale de la concentration calcique, une hétérogénéité temporelle a été détectée puisqu'une concentration plus élevée de Ca^{2+} astrocytaire est détectée à P15 comparé à celle détectée une semaine plus tard à P21 (Zheng et al., 2015).

Les signaux Ca^{2+} au sein d'un astrocyte peuvent être spontanés ou dus à l'activation d'un récepteur, comme décrit précédemment (Peakman & Hill, 1995; Porter & McCarthy, 1995). A l'origine, il avait été proposé que le glutamate libéré à la synapse active les récepteurs glutamatergiques métabotropiques des astrocytes, les mGluR5, qui induisent une augmentation du Ca^{2+} , ce qui a pour conséquence de générer des vagues Ca^{2+} intercellulaires (Dani, Chernjavsky, & Smith, 1992; Porter & McCarthy, 1996). Toutefois, la description uniquement *in vitro* de ce phénomène était décriée. *In vivo*, ces signaux Ca^{2+} intracellulaires ont d'abord été observés en conditions pathologiques, tels que dans la maladie d'Alzheimer ou en conditions épileptiques (Carmignoto & Haydon, 2012; Alexei Verkhratsky, Rodríguez-Arellano, Parpura, & Zorec, 2017). Plus tard, des signaux calciques astrocytaires ont été décelés dans le cortex à tonneaux à la suite de stimulations des vibrisses d'une souris *in vivo* (X. Wang et al., 2006), ce qui signifierait que ces signaux ont un rôle physiologique, bien que ce point soit toujours débattu.

A l'aide de nouvelles techniques comme l'imagerie biphotonique *in vivo* associée à des indicateurs Ca^{2+} génétiques (GECIs :genetically-encoded calcium indicators), un plus haut niveau de précision a pu être obtenu concernant les signaux Ca^{2+} astrocytaires intrinsèques. En effet, les astrocytes montrent des fluctuations de concentration de Ca^{2+} intracellulaire au sein d'une cellule, indépendamment de la signalisation Ca^{2+} de l'astrocyte voisin. Ainsi, il a été observé que ces signaux Ca^{2+} étaient bien plus présents dans les prolongements astrocytaires que dans le soma. On parle même de 3 types d'évènements : somatiques, émanant des prolongements principaux ou des prolongements distaux/des pieds astrocytaires (Bindocci et al., 2017; Srinivasan et al., 2015; Stobart et al., 2018). Ces différents types d'évènements peuvent être observés de manière indépendante et spontanée, être localisés au sein d'une cellule ou se propager aux cellules voisines (Di Castro et al., 2011). Tout ceci amène à penser que ces signaux astrocytaires sous-tendent des processus physiologiques fins et précis.

Il est important de noter que, bien que des signaux Ca^{2+} astrocytaires soient observées à la suite d'évènements synaptiques neuronaux, et ce en fonction de leur intensité (Aude Panatier et al., 2011), leur temporalité est très différente de celle d'un potentiel d'action. En effet, un évènement Ca^{2+} dure quelques secondes tandis qu'un évènement post-synaptique excitateur ou inhibiteur a une durée de l'ordre de la milliseconde. De plus, un délai est observé entre le début d'une stimulation électrique neuronale et l'apparition d'un

événement Ca^{2+} astrocytaire (Bekar, He, & Nedergaard, 2008; Schummers et al., 2008), ce qui laisse penser que les signaux Ca^{2+} astrocytaires ne sont pas impliqués dans l'intégration de l'information immédiate. Notons tout de même que les techniques permettant d'enregistrer les réponses électriques neuronales et Ca^{2+} astrocytaires ont elles aussi une cinétique différente, et qu'ainsi le délai temporelle de réponse Ca^{2+} observée est peut être biaisé par des limitations techniques. De plus, différentes études ont prouvé l'existence d'événements Ca^{2+} astrocytaires plus courts (Lind, Brazhe, Jessen, Tan, & Lauritzen, 2013; Lind et al., 2018; Winship, Plaa, & Murphy, 2007).

De plus, le Ca^{2+} astrocytaire semble pouvoir se propager à travers le réseau astrocytaire (Cornell-Bell, Finkbeiner, Cooper, & Smith, 1990). Cela a pu être observé *in vivo* dans le cervelet notamment, où les vagues Ca^{2+} se répandent sur des centaines de micromètres (Nimmerjahn, Mukamel, & Schnitzer, 2009). Bien que les mécanismes de propagation de ces vagues Ca^{2+} ne soient pas complètement connus, il semblerait que les jonctions communicantes formées par les Cxs ainsi que la signalisation purinergique soient mises en jeu (Fujii, Maekawa, & Morita, 2017; Haas et al., 2006; Scemes & Giaume, 2006)

4.2. Fonctions

Le Ca^{2+} est le messenger principal astrocytaire. L'activation des récepteurs astrocytaires induit une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, ce qui a diverses fonctions, que nous allons décrire ici.

Tout d'abord, à la barrière hématoencéphalique, il a été montré que les astrocytes contrôlait la vasoconstriction par un phénomène dépendant du Ca^{2+} . En effet, l'activation des mGluR astrocytaires augmente la concentration de Ca^{2+} astrocytaire qui induit l'activation de la phospholipase A2 et engendre la formation d'acide arachidonique, converti par la suite en agents vasoconstricteurs tels que les acides epoxyéicosatriénoïques (EETs) et la prostaglandine E2 (PGE_2) (Attwell et al., 2010).

Il est très largement accepté que la gliotransmission est dépendante des élévations de Ca^{2+} intracellulaire. Comme explicité précédemment, la libération de glutamate par exocytose est dépendante du Ca^{2+} intracellulaire, via l'activation des SNAREs (Hepp et al., 1999; Parpura et al., 1995). Par ailleurs, il a été montré que le régime d'activité neuronale pouvait influencer la gliotransmission, et ceci est sous-tendu par l'activité Ca^{2+} . Par exemple, lors d'une forte activité et d'une libération importante de glutamate dans la fente synaptique, il a été montré que le glutamate provenant des astrocytes servait à renforcer la transmission synaptique inhibitrice (Kang, Jiang, Goldman, & Nedergaard, 1998). En effet, la signalisation Ca^{2+} astrocytaire induit une libération de glutamate qui active les récepteurs métabotropiques post-synaptiques mGluRs, et diminuant ainsi la réponse excitatrice postsynaptique (Araque, Sanzgiri, Parpura, & Haydon, 1998).

Des évidences suggèrent aussi que la synchronisation des circuits neuronaux soit aussi sous-tendue par l'activité Ca^{2+} astrocytaire. Par exemple, il a été montré dans des cultures de tranches organotypiques hippocampiques que la chélation du Ca^{2+} empêche une activation synchrone neuronale, tandis que l'induction d'un relargage de Ca^{2+} la renforçait (Sasaki et al., 2014). La dépolarisation des neurones est uniquement atteinte par l'activation Ca^{2+} d'un groupe d'astrocytes, impliquant les réseaux astrocytaires dans la coordination

neuronale. Par ailleurs, la stimulation électrique d'un astrocyte induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire des astrocytes voisins, résultant en une forte activité synchronisée des neurones environnants (Poskanzer & Yuste, 2011). La chélation du Ca^{2+} dans un astrocyte abolit cet état, impliquant un schéma d'activation astrocytaire dans la synchronisation neuronale.

Notons que la signalisation Ca^{2+} astrocytaire reste encore partiellement incomprise et il est très probable qu'il existe plus d'un schéma d'activité Ca^{2+} induisant des libérations de gliotransmetteurs qui influencent la transmission synaptique. La signalisation Ca^{2+} astrocytaire semble varier spatio-temporellement, et en fonction de l'activité neuronale.

4.3. Les méthodes d'étude du calcium astrocytaire

C'est une règle d'or en recherche biologique, afin de comprendre le rôle physiologique d'un élément particulier, nous avons recourt à la délétion de cet élément afin de percevoir l'état du système en l'absence de l'élément étudié. Ainsi, dans l'étude des signaux Ca^{2+} astrocytaires, plusieurs méthodes existent pour les inhiber/supprimer.

L'une des premières méthodes pour restreindre ces signaux Ca^{2+} est l'utilisation de souris transgéniques. En effet, le Ca^{2+} astrocytaire puise sa source principal dans les réserves de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique, relargué dans le cytoplasme astrocytaire par le biais des récepteurs phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate (IP_3R) (Alexei Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Dans les astrocytes, le plus abondant de ces récepteurs est l' $\text{IP}_3\text{R}2$ (Holtzclaw, Pandhit, Bare, Mignery, & Russell, 2002). Ainsi, supprimer le gène codant pour ce récepteur dans les astrocytes (Xiaodong Li, Zima, Sheikh, Blatter, & Chen, 2005) a permis d'étudier les conséquences *in vivo* de l'altération des signaux Ca^{2+} (Q. P. Dong, He, & Chai, 2013). Cependant, il est important de noter que les sources de Ca^{2+} astrocytaire sont très diverses (Alexei Verkhratsky & Nedergaard, 2018), ainsi l'inhibition du récepteur $\text{IP}_3\text{R}2$ n'empêche pas la totalité de la signalisation Ca^{2+} astrocytaire. De plus, la délétion de l' $\text{IP}_3\text{R}2$ diminue fortement la fréquence et l'amplitude des événements Ca^{2+} dans le soma principalement, et moins dans les prolongements distaux (Srinivasan et al., 2015; Stobart et al., 2018). De plus, une altération de l'excitabilité neuronale, de la vasodilatation ou des défauts comportementaux ne sont pas toujours observés en utilisant ce modèle (Agulhon, Fiacco, & McCarthy, 2010; Bonder & McCarthy, 2014; Navarrete et al., 2012; Nizar et al., 2013; Petravicz, Boyt, & McCarthy, 2014; Petravicz, Fiacco, & McCarthy, 2008; M. W. Sherwood et al., 2017; Takata et al., 2011).

Ainsi, devant les limites de ce modèle, d'autres méthodes ont été mises en place, et plus précisément le « clamp » du Ca^{2+} astrocytaire (=verrouillage du Ca^{2+} astrocytaire à une concentration donnée). Par le biais de la méthode de patch-clamp, et à l'aide d'une solution intracellulaire contenant des chélateurs de Ca^{2+} , comme l'EGTA ou le BAPTA, le Ca^{2+} astrocytaire peut être fixé à une concentration définie. De fait, les variations de Ca^{2+} et la génération de vagues Ca^{2+} sont inhibées. L'impact du BAPTA sur le Ca^{2+} astrocytaire a d'abord été découvert *in vitro* (Z. Wang, Tymianski, Jones, & Nedergaard, 1997), puis ensuite appliqué à des études *ex vivo* qui ont permis de lier les déficiences en activité Ca^{2+} à divers effets physiologiques (Rusakov, 2015) et pathologiques (S. S. Hsu, Jan, & Liang, 2018;

Kim et al., 2015; Vlachaki Walker et al., 2017).

Une autre solution similaire a été développée, contenant de l'EGTA (un autre chélateur de Ca^{2+}) et a permis d'élucider le rôle des signaux Ca^{2+} astrocytaires dans les transferts d'eau lors d'une hypothermie (Salman et al., 2017). Cependant, ces chélateurs de Ca^{2+} intracellulaire ne permettent pas d'analyses *in vivo* et sont restreints à l'utilisation en tranches via la méthode de dialyse intracellulaire par patch-clamp.

Les astrocytes sont des cellules réagissant à leur environnement, notamment aux activités neuronales de manière intracellulaire via les signaux Ca^{2+} , ce qui fait d'eux des cellules très adaptatives. Maintenant, nous allons nous intéresser à un autre type d'adaptation astrocytaire, à plus grande échelle, la réactivité.

5. LA REACTIVITE ASTROCYTAIRE

5.1. Définition et généralités

Une des propriétés caractéristiques des astrocytes est leur capacité à réagir et à se transformer en réponse à différents stimuli (Escartin, Guillemaud, & Carrillo - de Sauvage, 2019). Cette réactivité astrocytaire est à la fois une réponse très hétérogène et polyvalente, (Sofroniew & Vinters, 2010), mais aussi très conservée, car commune à plusieurs espèces et présente lors de diverses pathologies (Kremer, Jung, Batelli, Rubin, & Gaul, 2017). Ces caractéristiques rendent son étude complexe.

De manière simplifiée, les astrocytes sont activés par différents signaux pathologiques (intra- ou extracellulaires, Figure 7), ce à quoi ils répondent par une variété de modifications. Ces modifications sont aussi bien structurelles, moléculaires (Adams & Gallo, 2018; Ceyzériat et al., 2018; Sekar et al., 2015), transcriptionnelles (Liddelw & Barres, 2017) et fonctionnelles. Elles durent aussi longtemps que le stimulus pathologique est présent, voire au-delà, et peuvent être réversibles (Hara et al., 2017).

Lorsqu'elles deviennent réactives, beaucoup de fonctions (voire toutes) de ces cellules sont altérées, comme la capture de neurotransmetteurs et d'ions, altérant l'homéostasie extracellulaire (Escartin et al., 2006; Tong et al., 2014). Notamment, il est intéressant de noter que les astrocytes réactifs peuvent interagir avec des cellules immunitaires du cerveau comme les microglies, voire se comporter comme elles (Adams & Gallo, 2018; Liddelw et al., 2017; Wilhelmsson et al., 2017).

Dans cette mesure, il est pertinent de se demander quels rôles ces cellules astrocytaires activées ont dans diverses physiopathologies cérébrales.

5.2. Implication et rôle en physiopathologie cérébrale

Dans certaines pathologies cérébrales, notamment les maladies neurodégénératives, la réactivité astrocytaire a été beaucoup étudiée. Les changements opérés par les astrocytes ont une influence sur le développement de la pathologie et renforcent les effets nocifs générés dans le cerveau (Chung et al., 2013; Liddelw et al., 2017). En particulier, l'équipe de B. Barres s'est focalisée sur le profil de réactivité dit « A1 » des astrocytes (par comparaison avec la réactivité des macrophages de type M1). Elle soutient que ce profil de réactivité astrocytaire est activé par la neuroinflammation et est caractérisé par la libération

des facteurs toxiques pour les neurones et les oligodendrocytes (Liddelow & Barres, 2017). Le rôle néfaste des astrocytes réactifs est particulièrement étudié dans des pathologies cérébrales où l'inflammation joue un rôle important, comme la maladie d'Alzheimer (Chun & Lee, 2018; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Le profil dit « A2 », en opposition au « A1 », aurait un rôle bénéfique pour le système nerveux central, un rôle réparateur (Sofroniew, 2009).

Par ailleurs, il a aussi été montré que la réactivité astrocytaire pouvait être bénéfique, notamment par la formation de cicatrice gliale (Anderson, Burda, Ren, Ao, O'Shea, et al., 2016; Bush et al., 1999) ou par la protection de l'excitotoxicité via une augmentation de la capture glutamatergique (Beurrier et al., 2010).

5.3. Mécanismes d'induction de la réactivité astrocytaire

La réactivité astrocytaire serait induite par différents mécanismes régis notamment par les voies de signalisation intracellulaires de NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Lian et al., 2015), et de STAT3 (Anderson, Burda, Ren, Ao, O'Shea, et al., 2016). La voie moléculaire du NFκB contrôle la production de cytokines, est associée à la survie cellulaire et l'inflammation neuronale (Kaltschmidt & Kaltschmidt, 2009; Mattson & Meffert, 2006) et est très activée au cours de maladies neurodégénératives (Hsiao, Chen, Chen, Tu, & Chern, 2013; Kaltschmidt, Uherek, Volk, Baeuerle, & Kaltschmidt, 1997). Il est important de noter que la voie d'activation NFκB est une voie ubiquitaire dans les pathologies (Gilmore, 2006). Quant à elle, l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT3 régule différentes fonctions cellulaires, comme la prolifération, la différenciation et est responsable de l'astrogénèse (F. He et al., 2005). Lors de la réactivité astrocytaire, la voie JAK-STAT3 a été mise en cause lors de la formation de cicatrice gliale (Anderson, Burda, Ren, Ao, O'Shea, et al., 2016; Grüsser et al., 2004). Cependant, elle serait impliquée dans la réactivité astrocytaire de manière plus globale (Ceyzériat, Abjean, Carrillo-de Sauvage, Ben Haim, & Escartin, 2016). Ici encore, il a été montré que cette voie est notamment activée par la production de cytokines (Jatiani, Baker, Silverman, & Premkumar Reddy, 2010).

Les voies de signalisation intracellulaires sont elles-mêmes activées par des facteurs exogènes. D'une part, les microglies activées à la suite d'une blessure du système nerveux central sécrètent des cytokines, qui peuvent induire une réactivité astrocytaire. En particulier, on note que l'interleukine 1 alpha (IL1α), le tumor necrosis factor alpha (TNF α), et la sous-unité 1q du complément (C1q) sont à l'origine de la prolifération d'astrocytes réactifs de type A1 (Liddelow et al., 2017). Récemment, la signalisation purinergique des microglies a aussi été pointée du doigt comme facteur d'induction de la réactivité astrocytaire (Shinozaki et al., 2014, 2017).

De plus, la production des espèces réactives de l'oxygène mitochondriales a aussi été liée à l'induction d'une réactivité astrocytaire (Alfonso-Loeches, Ureña-Peralta, Morillo-Bargues, La Cruz, & Guerri, 2014; Hsieh, Chi, Lin, Yang, & Yang, 2014). Les espèces réactives de l'oxygène sont des réactifs chimiques contenant de l'oxygène, produits naturels du métabolisme de l'oxygène ayant lieu dans les mitochondries, et sont importants pour la signalisation cellulaire et l'homéostasie ionique (Devasagayam et al., 2004; Zorov, Juhaszova, & Sollott, 2014).

Intéressons-nous maintenant aux changements opérés dans un astrocyte lorsqu'il devient réactif.

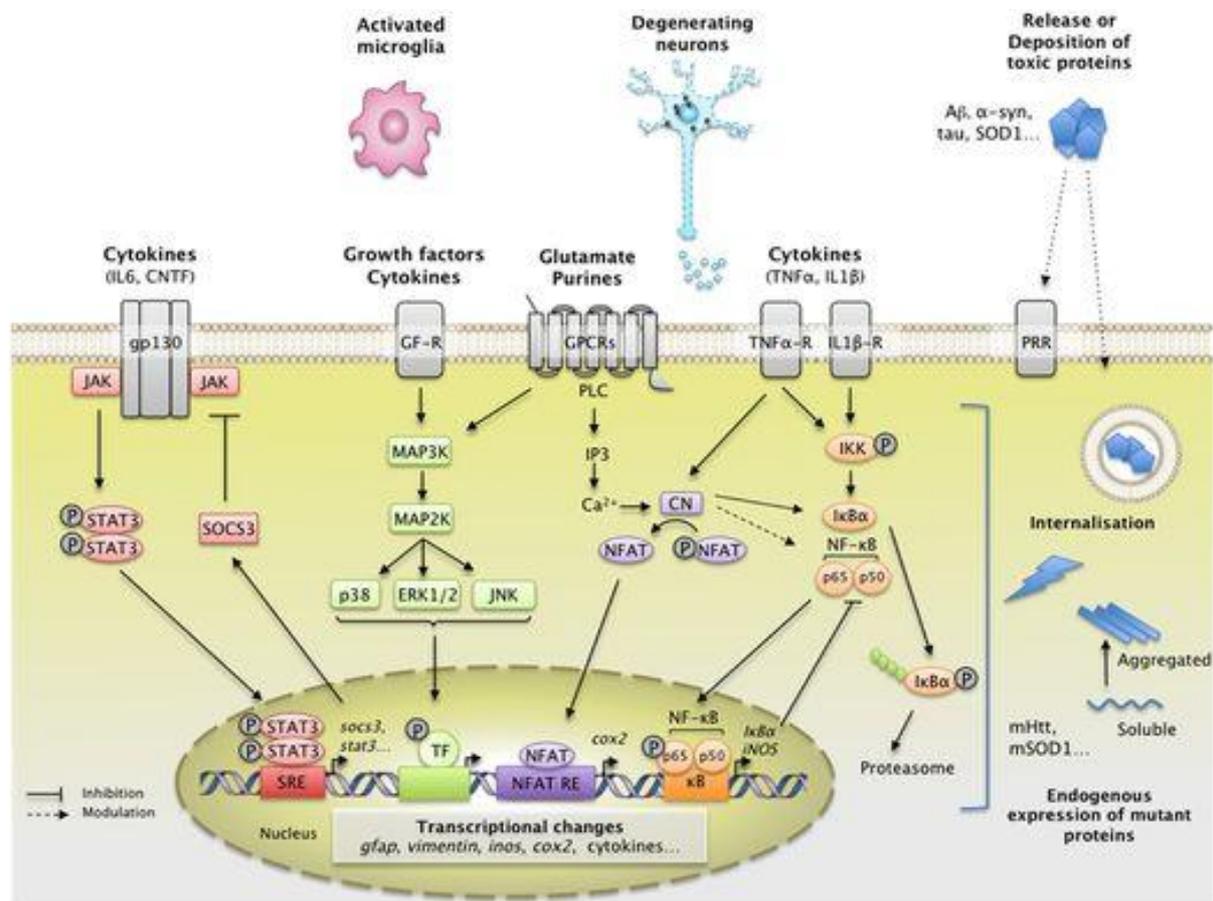


Figure 7: Différentes voies de signalisation de la réactivité astrocytaire
 Différents signaux moléculaires, libérés par des microglies activées, des neurones en dégénérescence ou des protéines toxiques environnantes, peuvent activer les voies de signalisation de la réactivité astrocytaire par le biais de différents récepteurs métabotropiques. Après différentes cascades moléculaires, le produit de chacune de ces voies a pour fonction d'induire des changements transcriptionnels dans les astrocytes. *Pris de Haim, Carrillo-de Sauvage, Ceyzériat, & Escartin, 2015.*

5.4. Comment reconnaître un astrocyte réactif ?

5.4.1. Changements moléculaires

Lorsqu'un astrocyte devient réactif, de multiples voies de signalisation intracellulaires s'activent et modifient l'expression de nombreuses protéines, dont les principales sont listées dans le tableau ci-après. Dans la plupart des formes de réactivité astrocytaire, l'expression de la GFAP est augmentée, ce qui en fait le marqueur préférentiel utilisé pour déterminer l'état réactif d'un astrocyte (Eddleston & Mucke, 1993; Hol & Pekny, 2015).

En plus de ces modifications moléculaires, des modifications morphologiques s'opèrent.

5.4.2. Changements morphologiques

Lors de la réactivité, plusieurs aspects de la morphologie astrocytaire sont modifiés. Le premier observé a été l'hypertrophie du soma (Anderson, Ao, & Sofroniew, 2014). Cependant, cette hypertrophie n'est pas une réponse universelle, mais plutôt une réponse hétérogène et variable en fonction du degré de sévérité et de la proximité de l'astrocyte à la blessure (Sofroniew & Vinters, 2010). Comme le soma astrocytaire est classiquement marqué par la GFAP, une augmentation des niveaux de GFAP a été souvent utilisée comme indicateur d'une réactivité astrocytaire, ce que j'ai aussi fait au cours de ma thèse. Il est tout de même important de noter qu'une augmentation des niveaux de GFAP dans un tissu peut être due à d'autres modifications indépendantes de la mise en place ou non d'une réactivité astrocytaire.

L'autre changement morphologique astrocytaire marquant induit par la réactivité est l'altération du domaine astrocytaire. Dans le tissu sain, les astrocytes occupent des domaines définis non superposés (Figure 8). Lors d'une réactivité faible à modérée, ces domaines sont préservés (Wilhelmsson et al., 2006). En revanche, lors d'une réactivité sévère, il y a une superposition de ces domaines astrocytaires (Figure 8) (Wanner et al., 2013).

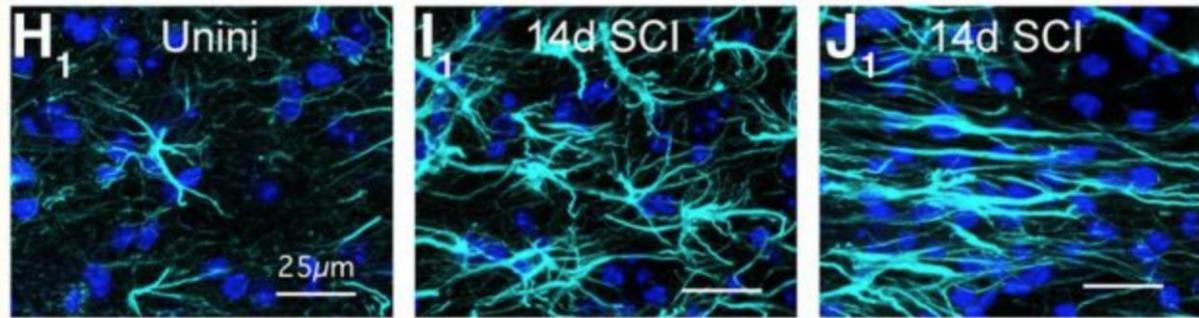


Figure 8 : Modifications morphologiques des astrocytes réactifs. Illustration de la modification de domaine astrocytaire générée par la réactivité astrocytaire. A gauche, on peut voir une zone non touchée par la blessure, un astrocyte non réactif, au milieu, une zone proche de la blessure (SCI : spinal cord injury) et à droite à l'endroit précis de la blessure. En cyan, le marquage GFAP, en bleu, le DAPI, barre de calibration, 25 μm . *Modifié d'après Wanner et al., 2013.*

| Aspect de l'astrocyte réactif | Effet modifié dans les astrocytes | Références |
|--|---|--|
| Structurel | GFAP ↑; Vimentine ↑; Nestine ↑ | (Eddleston & Mucke, 1993; Pekny & Nilsson, 2005) |
| Régulateurs de la transcription | NFκB↑; STAT3↑; cAMP↑; Olig2 ↑; mTor↑; SOX9↑ | (Brambilla et al., 2005; Ying Chen et al., 2008; Codeluppi et al., 2009; Herrmann et al., 2008) |
| Matrice extracellulaire et interactions entre cellules | Protéoglycans Chondroïtine sulfate ↑↓; collagènes ↑↓; laminines ↑; intégrines↑; cadherines↑↓; Ephrines↑; métalloprotéases ↑ | (Gris, Tighe, Levin, Sharma, & Brown, 2007; J. Y. C. Hsu et al., 2008; Silver & Miller, 2004; Wanner et al., 2008) |
| Régulateurs cellulaires de l'inflammation | Cytokines & Facteurs de croissance ↑↓; Glutathione ↑↓ | (Yongmei Chen et al., 2001; Eddleston & Mucke, 1993; Gris et al., 2007; John, Lee, & Brosnan, 2003; R. Swanson, Ying, & Kauppinen, 2005) |
| Homéostasie ionique et fluïdique | AQP4 ↑↓; Transporteurs Na/K ↑↓ | (Manley, Zador, Stiver, & Wang, 2009; Simard & Nedergaard, 2004) |
| Capture de neurotransmetteurs extracellulaires | Transporteur au glutamate ↑↓ | (Maragakis & Rothstein, 2006; Rothstein et al., 1996) |
| Régulateurs vasculaires | PGE ↑↓ NO↑↓ | (Gordon, Mulligan, & MacVicar, 2007; Iadecola & Nedergaard, 2007) |
| Purines & récepteurs | ATP↑↓; P2Y↑↓ | (Neary & Zimmermann, 2009) |
| Stress oxydatif et protection | NO ↑↓; NOS ↑↓; SOD ↑↓; Glutathione ↑↓ | (Yongmei Chen et al., 2001; Hamby, Hewett, & Hewett, 2006; R. Swanson et al., 2005) |
| Protéïnes des jonctions communicantes | Cx43↑↓ | (Retamal et al., 2007) |
| Provision énergétique | Lactate ↑↓ ³ | (Pellerin et al., 2007) |
| Formation et remodelage de la synapse | Thrombospondine ↑↓; C1q ↑↓ | (Christopherson et al., 2005; Stevens et al., 2007) |

Tableau 2 : Changements moléculaires d'un astrocyte réactif
Modifié d'après Sofroniew, 2009.

5.4.3. Autres changements

Lors d'une attaque du CNS, l'une des propriétés phares des astrocytes réactifs est leur pouvoir de formation d'une cicatrice gliale, protégeant ainsi le reste du cerveau (Adams & Gallo, 2018; Norton, Aquino, Hozumi, Chiu, & Brosnan, 1992). Récemment, il a été montré que ceci repose principalement sur la capacité de prolifération que les astrocytes réactifs acquièrent (Faulkner et al., 2004; Wanner et al., 2013). Ces astrocytes nouvellement recrutés dérivent de cellules exprimant la GFAP, ayant un profil morphologique et moléculaire de glie radiaire précurseur des astrocytes (Imura, Nakano, Kornblum, & Sofroniew, 2006). Ainsi la réactivité astrocytaire induit des changements fonctionnels, notamment un gain de fonction.

Enfin, la réactivité astrocytaire induit des changements d'expression de récepteurs, notamment de récepteurs métabotropiques au glutamate. Ces changements de récepteurs affectent notamment les réponses Ca^{2+} physiologiques des astrocytes (Hamby et al., 2012).

La réactivité astrocytaire est une propriété astrocytaire multifactorielle et aux diverses facettes. Dans cette thèse, nous nous intéresserons de près à la réactivité astrocytaire, en particulier à l'un de ses changements moléculaires, inconnu encore, et à son rôle encore peu exploré dans l'addiction.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié la réactivité astrocytaire en me basant sur plusieurs critères. Tout d'abord, j'ai regardé les modifications morphologiques des astrocytes. Ensuite, j'ai observé si des voies de signalisations intracellulaires connues pour induire la réactivité astrocytaire étaient activées, ainsi que si des changements moléculaires connus en conditions réactives étaient présents. Enfin, dans la mesure du possible, j'ai tenté de regarder si des modifications transcriptionnelles avaient lieu.

En conclusion de ce chapitre, les astrocytes attirent un intérêt grandissant en recherche actuellement, car ils sont impliqués dans toutes les fonctions cérébrales de manière physiologique à l'aide de diverses propriétés intrinsèques. Mais aussi, ils sont des acteurs clés de la transmission synaptique pathologique et présentent une plasticité et une réactivité innées qui en font des cibles d'étude privilégiée dans des situations pathologiques. Au cours de cette thèse, nous allons investiguer plus en détail comment ces différents aspects des astrocytes sont impliqués et/ou affectés par une situation pathologique : l'addiction.

Chapitre II- L'Addiction

1. DEFINITION ET CONTEXTE

1.1. Historique du terme "addiction"

A l'origine, le mot addiction provient du mot latin *ad-dicere* ("dire à") qui désignait les esclaves dans la civilisation romaine. Ces derniers n'avaient pas de nom et n'existaient qu'à travers leurs propriétaires. Le terme a ensuite évolué pour signifier une dépendance juridique d'un débiteur à son créancier au Moyen-Âge ("être addicté"), puis pour désigner un apprenti à son maître au XVIème siècle. Etymologiquement et historiquement, la notion d'addiction s'accompagne d'une perte d'indépendance et de liberté.

Plus récemment, plusieurs psychanalystes ont aidé à définir le terme, pour nous donner la signification que nous utilisons aujourd'hui. Parmi eux, Sigmund Freud, selon qui l'addiction correspondrait à un besoin primitif semblable à la dépendance d'un enfant à sa mère qui aurait mal évolué et aurait laissé des séquelles comportementales sous la forme de dépendances à l'âge adulte. Vers la fin du XXème siècle, le terme addiction comprenait à la fois une définition large et précise comprenant une variété de comportements qui, seulement une fois qu'ils étaient tous présents, composaient une addiction.

A présent, l'addiction est définie par l'Observatoire français des drogues et des toxicomanies (OFDT) comme la consommation de substances psychoactives ou comportement répété impossible à contrôler par l'individu en dépit de ses conséquences délétères (souffrance psychologique et troubles physiologiques). Ce terme s'applique à tous les produits (tabac, alcool, médicaments psychotropes, drogues illicites) et recouvre certaines conduites (jeux de hasard et d'argent, jeux vidéo, etc.). L'addiction inclut donc la notion de dépendance, mais aussi celle d'abus.

Aujourd'hui, les addictions aux substances licites et illicites représentent une grande inquiétude dans le domaine de la santé publique. En effet, selon une enquête de l'Observatoire Français de Drogues et des Toxicomanies (OFDT) réalisée en juin 2017, l'alcool et le tabac restent les produits addictifs les plus consommés en France (14 millions et 9 millions de consommateurs respectivement). On estime notamment qu'en 2015, l'alcool a été la cause de plus de 40 000 décès, et 73 000 causés par le tabac (le tabac étant considéré comme la première cause de décès évitable).

Concernant la cocaïne, il y aurait 450 000 utilisateurs récurrents en France, et plus de 2 millions de personnes qui en auraient déjà consommé. La mortalité est due essentiellement aux intoxications aiguës. Toutefois, il est difficile de donner un chiffre exact sur la mortalité suite aux drogues car les causes peuvent être différentes de l'overdose (infection notamment). Les chiffres sont souvent sous-estimés. Le registre spécifique des décès en relation avec l'abus de médicaments et de substances donne les informations concernant les substances utilisées et il y est estimé que la cocaïne serait responsable de 18% des décès par intoxication.

En outre, dans le domaine législatif, l'accent a été mis sur une politique de réduction de risques (plan gouvernemental 2013-2017), incluant la prévention auprès des jeunes, une lutte contre le trafic et une approche sanitaire avec notamment l'ouverture de la première salle de consommation à moindre risque (SCMR, plus connue sous le nom de salle de shoot)

à Paris en octobre 2016.

1.2. La définition du DSM

Le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux (en anglais "Diagnostic and statistic manuel of mental disorders") ou DSM, édité par l'Association Américaine de Psychiatrie, est une référence internationale pour définir les troubles psychiatriques. La pathologie est mentionnée comme des "troubles liés à une substance", lorsque l'addiction se réfère à une drogue, ou comme "troubles addictifs" lorsqu'il s'agit d'un comportement relatif à autre chose que des substances à proprement parler (le jeu, internet, le sexe...).

Ainsi, 11 critères sont énumérés afin de définir si le patient est dépendant ou non :

1. Surconsommation : le produit est souvent pris en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévu;
2. Longue durée : il existe un désir persistant ou des efforts infructueux, pour diminuer ou contrôler l'utilisation du produit;
3. Chronophage : beaucoup de temps est passé à des activités nécessaires pour obtenir le produit, utiliser le produit ou récupérer de leurs effets;
4. Craving ou une envie intense de consommer le produit;
5. Priorisation excessive : utilisation répétée du produit conduisant à l'incapacité de remplir des obligations majeures, au travail, à l'école ou à la maison;
6. Problèmes : utilisation du produit malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets du produit;
7. Isolement : des activités sociales, occupationnelles ou récréatives importantes sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation du produit;
8. Mise en danger : utilisation répétée du produit dans des situations où cela peut être physiquement dangereux;
9. Persistance et cercle vicieux : l'utilisation du produit est poursuivie bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par cette substance;
10. Tolérance, définie par l'un des symptômes suivants : a. besoin de quantités notablement plus fortes du produit pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré b. effet notablement diminué en cas d'utilisation continue d'une même quantité du produit;
11. Sevrage, caractérisé par l'une ou l'autre des manifestations suivantes : a. syndrome de sevrage du produit caractérisé b. le produit (ou une substance proche) sont pris pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage (Earle, 2014).

Ainsi lorsque pour une substance, 2 à 3 critères sont remplis, il s'agit d'une addiction dite légère. Si 4 à 5 critères sont remplis, il s'agit d'une addiction dite modérée, et lorsque 6 critères ou plus sont remplis, c'est une addiction sévère.

De manière simplifiée, l'addiction peut être définie comme un trouble neuropsychiatrique caractérisé par un désir continu de consommer de la drogue malgré les conséquences nocives (Zou et al., 2017).

1.3. L'addiction en recherche

En recherche, l'intérêt n'est pas d'établir un diagnostic, mais de déterminer comment un comportement addictif est encodé dans notre cerveau. Ainsi, l'addiction est traditionnellement étudiée en distinguant 3 phases : l'intoxication, correspondant au moment initial plus ou moins long de prise de drogues ; le retrait, moment d'une durée indéterminée pendant lequel le sujet ne prend pas du tout de drogues ; et la rechute, étape clé et brève définie par la reprise de drogue par le sujet (Wise & Koob, 2014).

L'intoxication correspond à un stade induit par les drogues à partir duquel, si la prise de drogue cesse, le sujet subira des effets physiques et/ou psychologiques dû au retrait de la drogue. Ceci s'explique car la drogue induit dans le cerveau une transmission non-physiologique (cf. 3.2.1.), et lorsque celle-ci cesse due à l'arrêt de prise de drogues, le cerveau doit compenser cette activation pathologique. Cela se traduit souvent par des symptômes physiques et/ou psychologiques (Evans & Cahill, 2016).

Le retrait de la drogue se manifeste par une batterie de symptômes, évoluant au cours du temps. Ils sont dus à l'adaptation du cerveau et du corps à un retour à des stimuli physiologiques. C'est l'étape centrale du processus addictif car c'est au cours de celle-ci que des changements durables peuvent être opérés. Elle est aussi variable que le nombre d'individus et de drogues concernés et c'est pourquoi l'étudier est si crucial (Piper, 2015).

La rechute est l'étape charnière du processus addictif car elle représente à la fois la conséquence des étapes précédentes, et celle à éviter à tout prix. La rechute vers la prise de drogues peut être sous-tendue par différents aspects tels que le stress ou l'environnement. L'apparition ou non de la rechute dépend énormément des paramètres de l'intoxication (durée, doses, contexte) et du retrait (durée, stratégies de compensation) (Y. Dong, Taylor, Wolf, & Shaham, 2017).

Toutes ces étapes sont intimement liées et c'est pourquoi les étudier toutes et leurs corrélats neuronaux est la clé pour éviter l'apparition de la rechute. Aujourd'hui, la recherche s'intéresse aux différentes régions du cerveau impliquées dans les phases de l'addiction et leurs changements de connectivité afin de mieux pouvoir appréhender cette pathologie qu'est l'addiction (Koob & Volkow, 2010).

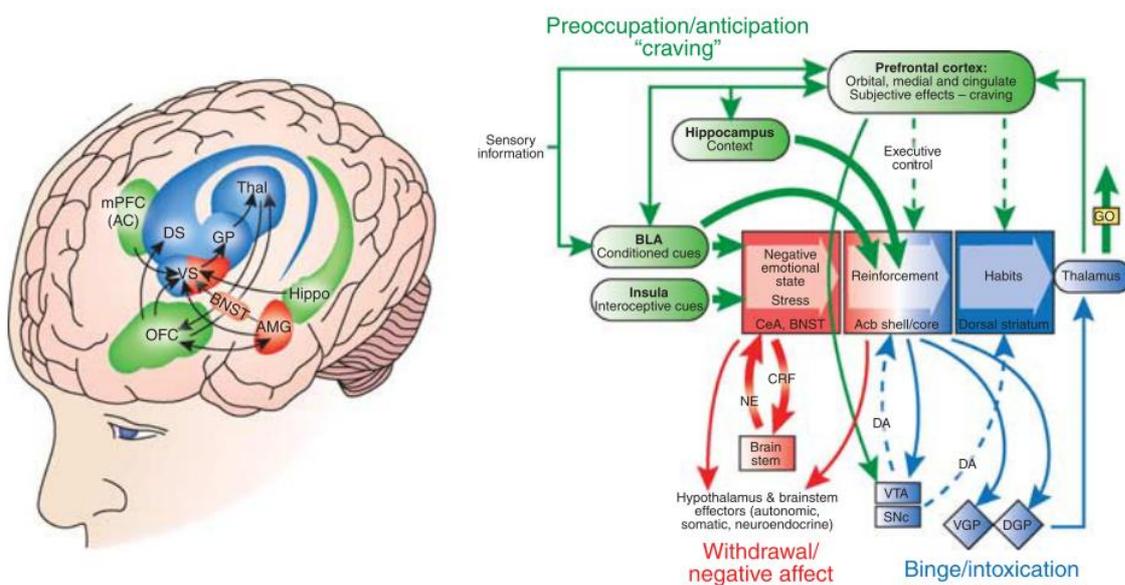


Figure 9 : Les différentes parties du cerveau impliquées dans les phases de l'addiction. Les zones responsables de l'encodage des habitudes, comme le thalamus ou le globus pallidus, sont touchées par la première phase du processus addictif, l'intoxication (en bleue). L'effet négatif du retrait est quant à lui encodé dans d'autres zones telles que l'amygdale ou l'hypothalamus, qui agissent sur l'état émotionnel et le stress (en rouge). Enfin, le craving présent lors de la rechute touche des zones agissant sur le renforcement d'un comportement comme le cortex préfrontal et l'hippocampe. DS : striatum dorsal. GP : globus pallidus. Thal : thalamus. VS : striatum ventral. BNST : bed nucleus of stria terminalis. AMG : amygdale. Hippo : hippocampe. OFC : cortex orthofrontal. mPFC : cortex préfrontal médian. BLA : amygdale basolatérale. VTA : aire tegmentale ventrale. SNc : substance noire compacte. VGP/DGP : globus pallidus ventral/dorsal. DA : dopamine. NE : norepinephrine. CRF : corticotropin-releasing factor. CeA : Noyau central de l'amygdale. *D'après Koob & Le Moal, 2008.*

2. LE CIRCUIT DE LA RECOMPENSE

2.1. L'aire Tegmentale ventrale, génératrice de Dopamine

L'aire tegmentale ventrale (VTA), ainsi que sa région voisine la substance noire compacte, constituent les noyaux primaires de production de dopamine dans le cerveau (Oliva & Wanat, 2016; L. W. Swanson, 1982). Les neurones dopaminergiques de la VTA projettent dans différentes régions telles que le cortex, le noyau accumbens, le striatum dorsal, l'amygdale, le globus pallidus et l'habenula latérale (Beier et al., 2015; Menegas et al., 2015). Environ 25% des neurones de la VTA sont dopaminergiques, et agissent non seulement comme interneurons locaux, mais projettent aussi, à différents degrés, dans les régions susmentionnées (Johnson & North, 1992; Tan et al., 2012; Van Zessen, Phillips, Budygin, & Stuber, 2012).

Le cortex est responsable des fonctions cognitives dites « supérieures » et dans le cadre du circuit de la récompense, c'est le cortex préfrontal qui est la cible de la VTA (voir paragraphe 2.2).

Le noyau accumbens est situé dans le striatum ventral et encode des informations comportementales ayant un but, c'est-à-dire qu'il renforce le traitement d'informations contextuelles destinées à l'accomplissement d'une tâche. Dans le cas du circuit de la récompense, il renforce le traitement des informations ayant mené à la récompense dopaminergique (voir paragraphe 2.3).

Le striatum dorsal code pour le contrôle d'action habituelle (Burton, Nakamura, & Roesch, 2015) et l'action de la dopamine sur cette zone permet de renforcer l'action permettant d'acquérir la récompense, encodée via l'action de la dopamine.

L'amygdale joue un rôle essentiel dans l'encodage de la motivation en prenant en compte les stimuli négatifs, associés à la peur, et positifs, associés à une récompense (Janak & Tye, 2015).

Le globus pallidus se trouve dans le ganglion de la base, qui comporte une variété de noyaux impliqués dans des fonctions motrices, mais aussi cognitives telles que les interactions sociales, le langage et les comportements répétitifs (Subramanian et al., 2017). Le globus pallidus se divise en deux régions : le globus pallidus interne qui reçoit et intègre des informations motrices provenant notamment du striatum et le globus pallidus externe qui traite ces informations motrices et les redirige vers différentes zones du ganglion de la base (Hegeman, Hong, Hernández, & Chan, 2016; Nambu, 2007). Chez l'Homme, le globus pallidus est notamment impliqué dans la maladie d'Huntington (Singh-Bains, Waldvogel, & Faull, 2016).

L'habenula latérale est une structure évolutivement très conservée, et encode des informations contextuelles et environnementales afin de générer des réponses comportementales dynamiques et adaptatives. (Mizumori & Baker, 2017). Les transmissions non physiologiques dans cette zone ont des conséquences sur la motivation à générer une action, et elle a d'ailleurs un rôle central dans la pathologie de la dépression (Yang, Wang, Hu, & Hu, 2018).

Ainsi, l'information de la récompense dans notre cerveau agit à un niveau cognitif (cortex), émotionnel (amygdale), moteur (globus pallidus) et enregistre les facteurs externes (habenula latérale) qui ont apportés cette récompense, afin d'engendrer une

action habituelle (striatum dorsal) qui durera sur le long-terme (nucleus accumbens), favorisant le sujet à répéter l'expérience. C'est la base du circuit de la récompense.

En effet, la récompense se traduit par une libération de dopamine par les neurones de la VTA à travers notre cerveau, que ce soit par une stimulation physiologique ou artificielle et potentiellement pathologique, comme c'est le cas du mode d'action des drogues addictives (Cooper, Robison, & Mazei-Robison, 2017). Lors de la prise de drogue, l'action de la dopamine est exacerbée, à l'aide de différents moyens pharmacologiques dépendants des drogues en question. Ainsi, tout ce système est suractivé, ce qui a pour conséquence un dérèglement comportemental autour de la prise de drogue.

2.2. Le cortex Préfrontal ou le siège de la subjectivité

Le cortex préfrontal se divise en plusieurs sous-régions (cortex préfrontal ventral, médiolatéral, médian, ventrolatéral, ventromédian, dorsolatéral, orbitofrontal) toutes impliquées à différents degrés dans les processus addictifs (Goldstein & Volkow, 2011). Les neurones pyramidaux glutamatergiques projettent principalement dans le noyau accumbens, ce qui permet à ce dernier de recevoir un stimulus environnemental, mais aussi dans l'aire tegmentale ventrale, établissant ainsi une boucle positive de rétro-contrôle. Par ailleurs, il reçoit des afférences dopaminergiques de la VTA, à l'origine de son implication dans le circuit de la récompense. Cette région se trouve donc à l'interface entre le conscient et l'inconscient.

Le cortex préfrontal joue un rôle central dans les circuits neuraux de l'addiction par sa régulation des régions limbiques, ainsi que par son contrôle sur des fonctions cognitives dites « hautes » (conscience des actions, attribution de la saillance et self-control) (N. D. Volkow, 2000). Il reçoit des projections dopaminergiques directes de l'aire tegmentale ventrale, et à ce titre, se retrouve directement impacté par la prise de drogue. Ainsi, son activité est accrue à la suite d'une prise de drogue (Goldstein & Volkow, 2011) résultant en diverses modifications des fonctions cognitives qu'il encode. Il a notamment été montré un syndrome de baisse de sensibilité envers des stimuli aversifs à la prise de drogue et une inhibition de la réponse adaptative contraire à la prise de drogue (Goldstein & Volkow, 2002). Ainsi, sa suractivation lors de la prise de drogue oriente la motivation principale vers cette action à défaut d'autres activités, et engendre des comportements extrêmes ayant pour but l'obtention de drogue (Nora D. Volkow, Fowler, & Wang, 2003; Nora D Volkow & Li, 2004).

Au cours de la phase d'abstinence de drogues, il a été montré que le cortex préfrontal était particulièrement sensible aux signaux environnementaux évoquant la drogue (stimulus sensoriel ou spatial notamment). En effet, diverses études impliquant différentes drogues montrent une suractivation du cortex préfrontal lorsque des signaux associés à la drogue sont présentés au sujet (Brody et al., 2002; H. Garavan et al., 2000; Heinz et al., 2007), et ce même sur le long-terme (Grüsser et al., 2004). Il est important de noter que cette réponse corticale est corrélée avec un comportement de craving et est dépendante de la sévérité de l'usage de drogues (Brody et al., 2002; Yalachkov, Kaiser, & Naumer, 2009). Pour résumer, l'exposition du sujet à un environnement ressemblant à celui associé à la prise de drogue mime l'effet de cette dernière sur l'activation préfrontale.

Or nous savons qu'une activation glutamatergique par le cortex préfrontal est

nécessaire et suffisante pour induire un sentiment de craving et un comportement de recherche de drogue (Wolf, 2011, voir chapitre 3). Ainsi, toutes ces données nous permettent de conclure que la rechute est sous-tendue par le cortex préfrontal.

Le cortex préfrontal, de par son codage environnemental, sa modulation comportementale et sa capacité à prioriser certaines tâches, est donc une zone clé dans le développement et la mise en place de l'addiction. De plus, dans le cas de la cocaïne, son activation est corrélée avec une augmentation de la réponse motrice (Hugh Garavan, Kaufman, & Hester, 2008)

2.3. Le Noyau Accumbens, à la croisée des chemins

2.3.1. Le Noyau Accumbens au cœur du circuit de la récompense

Situé dans le striatum ventral, le noyau accumbens (NAc) est considéré comme l'interface essentielle entre les systèmes moteur et limbique. Cette région code pour toute action motivée par un but, c'est à dire tout comportement entraînant une récompense, c'est donc une région encodant le lien entre action et résultat (Mogenson, Jones, & Yim, 1980). Ainsi, elle se situe au centre de la circuiterie de la récompense, à la croisée des chemins neuronaux.

Le NAc reçoit des afférences glutamatergiques du cortex préfrontal, de l'amygdale et de l'hippocampe, recevant respectivement ainsi les informations contextuelles et environnementales, émotionnelles et mnésiques, respectivement. Le NAc reçoit aussi des afférences dopaminergiques de la VTA, comportant la récompense, la dopamine (Russo & Nestler, 2013, voir figure 1). Par ailleurs, les neurones épineux moyens (medium spiny neurons, MSNs) GABAergiques du NAc projettent dans le globus pallidus interne et la substance nigra reticulata, ayant ainsi un effet moteur (positif ou négatif, cf partie sur la voie directe et indirecte).

Ainsi, le NAc code tout type d'informations pour en déduire un comportement, c'est à ce titre que la connectivité de cette région est grandement affectée par les drogues. En effet, si le NAc a pour but de compiler les informations externes et internes pour en déduire un comportement motivé par la réception d'une récompense, il exhibera des comportements non habituels suivant que la réception d'une récompense est exacerbée.

2.3.2. La dualité de la structure

Son hétérogénéité structurelle permet de diviser le noyau accumbens en 2 régions, le cœur (core) et la coquille ou périphérie (shell) (Ikemoto, 2010; D. S. Zahm & Brog, 1992; Daniel S Zahm, 2000). Le cœur est plus impliqué dans l'apprentissage des actions pendant les comportements motivés par un but (Carelli, 2004; Saddoris, Sugam, Cacciapaglia, & Carelli, 2013) tandis que la périphérie code la valeur motivationnelle (Kelley, 2004; Saddoris, Cacciapaglia, Wightman, & Carelli, 2015).

Alors que les deux sous-régions reçoivent des afférences glutamatergiques préfrontales, le cœur projette principalement dans la substance noire, alors que la périphérie cible plutôt la VTA (Heimer, Zahm, Churchill, Kalivas, & Wohltmann, 1991;

Ikemoto, 2010; Usuda, Tanaka, & Chiba, 1998; D. S. Zahm & Brog, 1992).

Au-delà de la dualité structurelle, le NAc présente aussi une dualité cellulaire. En effet, bien que 95% des cellules accumbales soient des MSNs GABAergiques, ces derniers se divisent en deux distinctes populations : les neurones exprimant le récepteur à la dopamine D1, et ceux exprimant le récepteur D2. Ces deux sous-types de neurones sont usuellement apparentés aux voies directe et indirecte, à l'origine du fonctionnement des ganglions de la base (Albin, Young, & Penney, 1989). Ainsi, il est couramment dit que la voie directe, originant des MSNs D1 qui projettent dans la substance noire reticulée, est pro-locomoteur. Tandis que la voie indirecte, dont les MSNs D2 sont les médiateurs, par le biais de leur projection dans le globus pallidus, a vocation à réduire l'activité locomotrice (Ferguson et al., 2011; Wall, DeLaParra, Callaway, & Kreitzer, 2013). Cependant, la binarité de ce circuit direct/indirect est de plus en plus débattue aujourd'hui (Calabresi, Picconi, Tozzi, Ghiglieri, & Di Filippo, 2014; Kupchik et al., 2015; Kupchik & Kalivas, 2017).

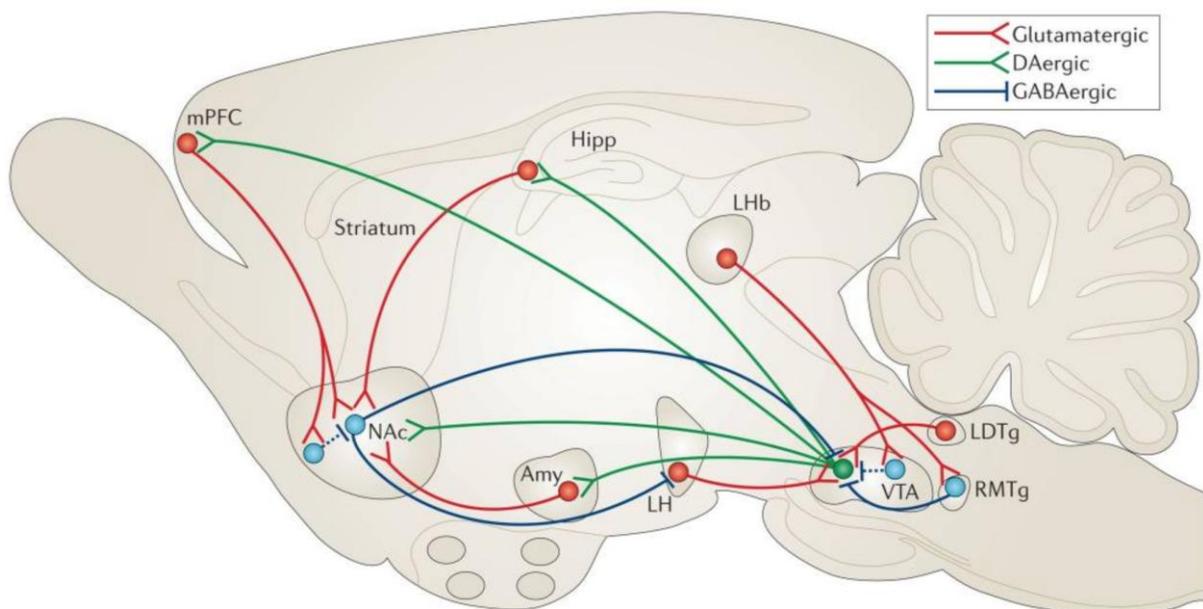


Figure 10 : Schéma du circuit de la récompense chez la souris. NAc=Nucleus Accumbens ; PFC= cortex préfrontal médian ; Amy=Amygdale ; LH=hypothalamus latéral; VTA= aire tegmentale ventrale; Hipp=Hippocampe ; Lhb= habenula latérale; LDTg= tegmentum latéral dorsal ; RMTg= noyau tegmental rostro-médian. Les traits rouges représentent les projections glutamatergiques, les bleus les GABAergiques, et les verts les dopaminergiques. D'après de Russo & Nestler, 2013.

3. L'ACTION DES DROGUES, EXEMPLE DE LA COCAÏNE

3.1. Pharmacologie de la cocaïne

La cocaïne dérive des plantes d'*ertythroxylum coca* ou autres espèces d'*erythroxylum* et est un psychostimulant très addictif. Elle peut être inhalée, injectée dans le flux sanguin ou fumée. Ses effets comprennent l'euphorie, l'anxiété, l'hyperactivité, la perte d'appétit et une possibilité de mort subite due à un arrêt cardiaque (Grabowski, 1984).

La cocaïne affecte 2 organes : le cœur et le cerveau. Au niveau du cœur, la prise de cocaïne a été associée à différentes pathologies cardiaques (Schwartz, Rezkalla, & Kloner, 2010). Au niveau cérébral, la cocaïne agit sur les récepteurs dopaminergiques, sérotoninergiques et noradrénergiques pour en bloquer leur capture (Figure 10). Son potentiel addictif est principalement dû à son effet sur les niveaux de dopamine (Sulzer, 2011).

Ainsi, la majorité des études se focalisent sur les mécanismes par lesquels l'augmentation des niveaux de dopamine engendrent un comportement addictif (Korpi et al., 2015). Il est donc intéressant de s'intéresser aux modifications cérébrales générées par une prise de cocaïne.

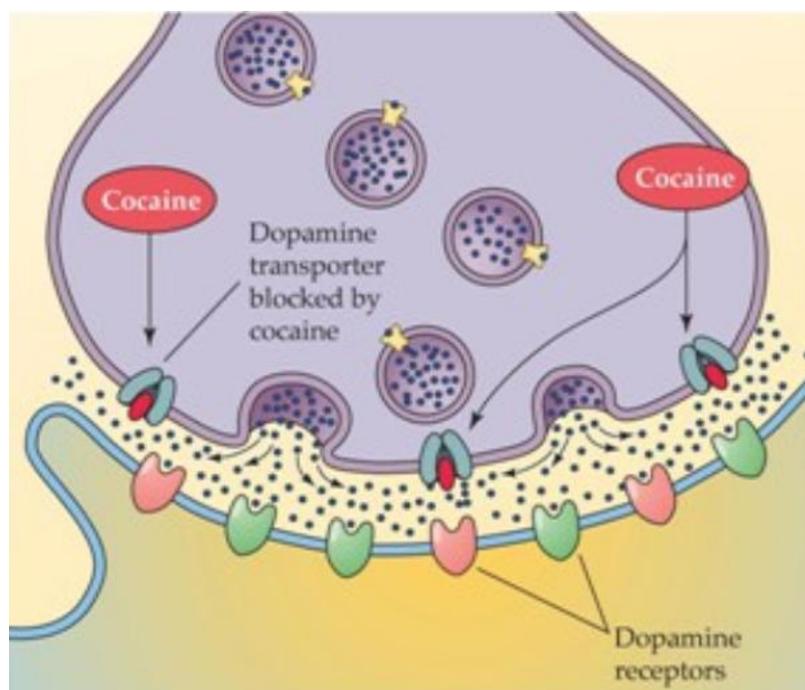


Figure 11 : Mode d'action de la cocaïne. La cocaïne (représentée en rouge) bloque le transporteur à la dopamine (DAT) présynaptique (neurone dopaminergique émanant de la VTA) et bloque sa capture. Ainsi, il y a un niveau important de dopamine qui s'accumule dans la fente synaptique, qui se fixe sur les récepteurs dopaminergiques postsynaptiques (MSNs du NAc notamment), résultant en une activation non physiologique et une réponse postsynaptique exacerbée. *D'après Meyer, 2013.*

3.2. Changements induits par la cocaïne dans le Noyau Accumbens

3.2.1. Changements morphologiques neuronaux

Une des plasticités induites par la cocaïne la plus étudiée est celle des épines dendritiques des MSNs du NAc. En effet, il a été montré que les changements

morphologiques des épines dendritiques des MSNs sont directement corrélés avec les changements comportementaux (Robinson & Kolb, 2004). La première chose que l'on puisse dire sur ces changements induits par l'exposition à la cocaïne, c'est qu'ils sont très dépendants du moment de l'observation. En effet, peu après l'exposition à la cocaïne, on note une augmentation du nombre d'épines fines et immatures, plus plastiques (Russo et al., 2010; Shen et al., 2009).

Ces épines contiennent des récepteurs NMDA mais pas ou peu de récepteurs AMPA et représenteraient l'augmentation du stock de synapses silencieuses (Huang et al., 2009; Malenka & Nicoll, 1999). Les synapses silencieuses sont des synapses contenant uniquement des récepteurs NMDA, elles ne sont pas actives dans des conditions physiologiques, d'où leur nom, mais sont témoins d'une potentielle plasticité glutamatergique à venir, car leur recrutement augmente la réponse postsynaptique. Si ces synapses induisent initialement une dépression postsynaptique (Shen et al., 2009), elles sont en revanche les synapses qui peuvent être recrutées pour générer de la LTP (Marie, Morishita, Yu, Calakos, & Malenka, 2005).

Une fois le traitement à la cocaïne terminé, les épines dendritiques nouvellement formées et riches en récepteurs NMDA sont transitoires, et se rétractent ou se consolident en épines dendritiques en forme de champignon, contenant de forts niveaux de récepteurs AMPA hétéromères (récepteurs ayant perdu leur sous-unité GluR2, ayant une conductance plus grande que ceux possédant la sous-unité GluR2) (Boudreau, Reimers, Milovanovic, & Wolf, 2007; Boudreau & Wolf, 2005).

Ainsi, des modifications morphologiques des épines dendritiques sont mesurables (Shen et al., 2009), ainsi que les modifications moléculaires, se traduisant par une augmentation du ratio AMPA/NMDA, et une augmentation de l'amplitude des mEPSCs (Kourrich et al., 2007; Pascoli et al., 2014).

De plus, il a été démontré que lors du retrait de la drogue, il est impossible de déclencher une LTD dans le NAc (Martin et al., 2006).

Au moment d'une rechute, expérimentalement reconstituée par une injection de dose après un certain temps de retrait, appelée « challenge », les épines dendritiques redeviennent fines et riches en récepteurs NMDA, se traduisant par une baisse du ratio AMPA/NMDA, revenant à un niveau similaire à celui obtenu après une injection de cocaïne (Russo et al., 2010; Shen et al., 2009; Thomas et al., 2001).

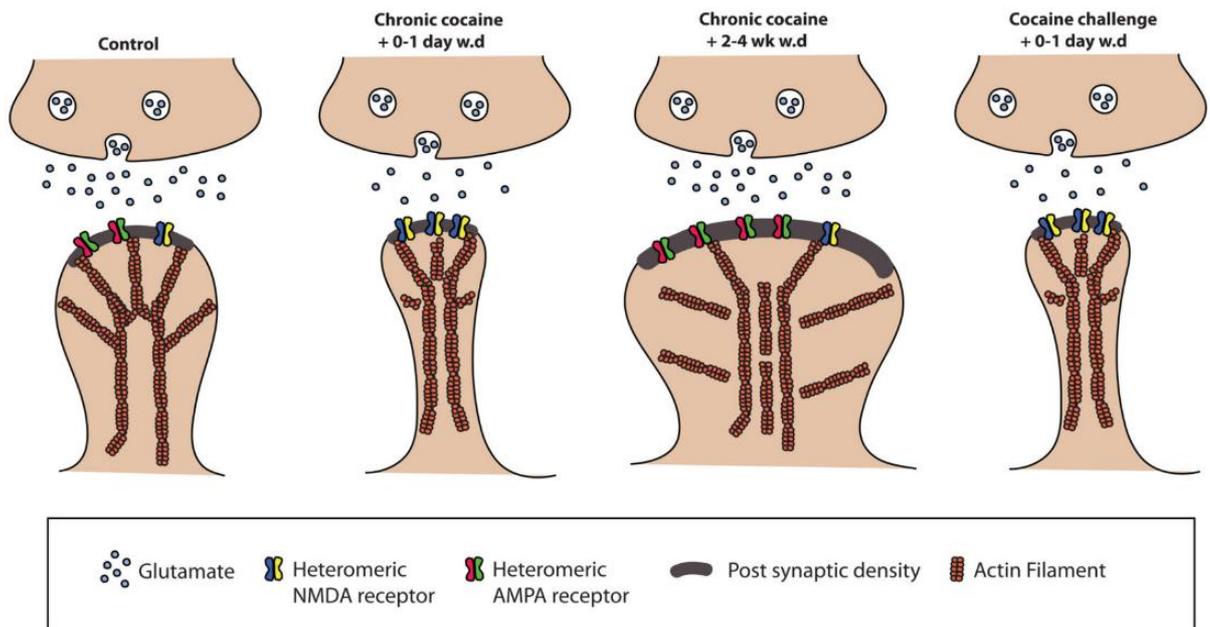


Figure 12 : Modèle de plasticité structurale des épines dendritiques mise en place lors de l'addiction. Une injection chronique de cocaïne induit une plasticité des récepteurs AMPA et NMDA des MSNs du NAc, ainsi qu'un changement structural de l'épine dendritique. Suite à un retrait court de cocaïne, on note l'expression en surface de récepteurs NMDA et une diminution de la taille de l'épine, témoignage de la formation de synapses silencieuses et d'une LTD. Au cours des périodes plus longues de retrait, ces changements synaptiques s'inversent et on note une augmentation du nombre de récepteurs AMPA en surface accompagnée d'une consolidation synaptique d'une épine en configuration dite « de champignon », témoignage de la mise en place d'une LTP. Ces effets s'inversent à nouveau lors d'un nouveau contact avec la drogue revenant à une forme LTD de la synapse. D'après Russo et al., 2010.

3.2.2. Changements morphologiques astrocytaires

L'intérêt pour les astrocytes dans les circuits de l'addiction est relativement récent (cf Chapitre III pour plus d'informations sur le sujet), d'autant plus lorsqu'il s'agit de leur morphologie. Plusieurs études, parfois contradictoires, ont notamment montré des changements d'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) astrocytaire dans le NAc après administration de cocaïne (Bowers & Kalivas, 2003; Scofield et al., 2016). Ces changements d'expression de GFAP ont été liés à des changements morphologiques des astrocytes dans le NAc spécifiquement (Scofield et al., 2016; Testen, Sepulveda-Orengo, Gaines, & Reissner, 2018). En revanche, bien qu'ils aient été décrits, les mécanismes sous-jacents restent inconnus. Au cours de ma thèse, nous avons exploré ces mécanismes de modifications morphologiques astrocytaires et leur influence sur la transmission synaptique dans le NAc.

Par ailleurs, une récente étude faite *in vitro* suggère que la cocaïne induit des changements d'expression de protéines du cytosquelette astrocytaires, ce qui pourrait affecter leur morphologie (Badisa et al., 2015). Encore plus récemment, une étude a montré que l'auto-administration de cocaïne induisait une réduction des contacts entre les neurones du Noyau Accumbens et les prolongements astrocytaires pérисynaptiques

(Siemsen et al., 2019), suggérant un lien direct entre neurotransmission induite par la cocaïne et morphologie astrocytaire.

3.2.3. Changements de plasticité induits par la cocaïne dans le Noyau Accumbens

Les changements principaux induits par la cocaïne sont des changements dans la plasticité du circuit. Le changement principal de plasticité a lieu sur le circuit médié par les neurones exprimant le récepteur à la dopamine D₁, aussi appelée la voie directe. En effet, il a été montré que l'activation de cette voie spécifiquement induit une augmentation des comportements classiquement mesurés pour étudier l'addiction à la cocaïne (sensibilisation locomotrice, conditionnement de préférence de place ou auto-administration) (Lobo et al., 2010 ; Heinsbroek et al., 2017, Heusner & Palmiter, 2005). A contrario, l'inhibition ou le blocage spécifique de cette voie réduit l'expression de ces mêmes comportements (Hikida et al., 2010 ; Chandra et al., 2013 ; Calipari et al., 2016 ; Pardo-Garcia et al., 2019 ; Yager et al., 2019).

Une autre voie ayant été mise en cause dans les changements induits par la cocaïne dans le noyau accumbens est celle provenant du cortex préfrontal et médiée par l'action du glutamate. En effet, la potentiation de cette voie engendre une augmentation dans l'expression comportementale de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne (Pascoli et al., 2011). La plasticité glutamatergique dans le NAc de manière plus générale est une composante essentielle des changements de comportements induits par la cocaïne (Quintero, 2013).

Au cours de cette thèse, ces deux voies et leur plasticité induite par la cocaïne ont été étudiées.

3.2.4. Autres changements induits par la cocaïne dans le Noyau Accumbens

Les changements de plasticité induits par la cocaïne s'accompagnent d'autres modifications intrinsèques aux MSNs du NAc, notamment des changements dans les sous-unités des récepteurs au glutamate (Lüscher & Malenka, 2011). Les changements de sous-unités des récepteurs AMPA (Figure 12) participent à la mise en place d'une plasticité et d'une sensibilisation locomotrice (Hai-Feng et al., 2014). De plus, les récepteurs NMDA subissent aussi des modifications d'expression de sous-unités, et il a notamment été montré que la surexpression de la sous-unité GluN₁ est liée à l'augmentation de la plasticité glutamatergique et de leur résultante comportementale (Joffe et al., 2017). Pour plus d'informations concernant les changements induits par la cocaïne, voir revues spécifiques (Wolf, 2010 ; Lüscher & Malenka, 2011 ; Salery et al., 2019).

3.3. Modèles d'étude comportementale : la sensibilisation locomotrice

Basés sur les critères d'addiction et de dépendance définis dans le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux, différents modèles comportementaux sont utilisés sur les rongeurs. Ainsi, il est possible de mesurer la volonté de l'animal à consommer de la drogue avec des procédures telles que l'auto-administration. En effet ces

tests, dits « contingents » car l'animal maîtrise les quantités de drogues reçues, sont utilisés pour mesurer la prise de drogues volontaire par l'animal, dans un contexte indépendant de la volonté de l'expérimentateur (Planeta, 2013). Cependant ici, nous nous intéressons aux modèles dits « non-contingents », ceux où l'expérimentateur est décisionnaire de la dose de drogue administrée à l'animal.

Une des particularités de la cocaïne, et une des raisons pour laquelle c'est un modèle très récurrent d'étude de l'addiction, est sa capacité à engendrer une forte hausse de l'activité locomotrice de l'animal au cours des dizaines de minutes suivant la prise de drogue (Robinson & Berridge, 2003; Shuster, Yu, & Bates, 1977). Le terme « sensibilisation » définit l'augmentation de la réponse à un stimulus après une exposition répétée à ce stimulus. Cet effet est dû à une augmentation de la réponse dopaminergique dans le NAc. Ainsi, l'administration répétée d'une drogue permet à celle-ci de produire des effets locomoteurs exacerbés comparés à ceux observés initialement, et ce même des mois plus tard (Vanderschuren & Pierce, 2010; Wise & Bozarth, 1987). Ainsi, la sensibilisation constitue un modèle utile pour étudier les processus addictifs car il est un corrélat direct entre phénotype locomoteur et modification de la circuiterie neuronale, sous-jacente à l'aspect motivationnel qui opère la transition entre recherche de drogues et addiction (Robinson & Berridge, 2001, 2008).

La sensibilisation locomotrice se traduit donc par une administration répétée de la drogue par l'expérimentateur, suivie de la mesure de l'activité locomotrice. Il a aussi été montré qu'une dose dite « challenge », administrée plusieurs jours après un retrait de la drogue, aura un effet locomoteur très fort sur l'animal ayant reçu plusieurs doses de cocaïne, en comparaison à celui ayant reçu une solution contrôle saline (Steketee & Kalivas, 2011), prouvant que la modification neurale ayant lieu lors des premières injections est pérenne.

Maintenant que nous avons élucidé les mécanismes neuraux sous-jacents à l'addiction, et que nous savons comment les astrocytes peuvent influencer sur la neurotransmission, nous allons nous intéresser au rôle des astrocytes dans la circuiterie de l'addiction.

CHAPITRE III- ROLE DES ASTROCYTES DANS L'ADDICTION A LA COCAÏNE : IMPLICATION DANS LE NOYAU ACCUMBENS

1. RÔLE DES ASTROCYTES DANS LA SYNAPTOPATHIE GLUTAMATERGIQUE

Comme décrit dans le chapitre précédent, l'administration de cocaïne induit une plasticité, et plus particulièrement glutamatergique, très forte dans le NAc, En effet, la cocaïne induit indirectement une augmentation de la transmission glutamatergique dans le NAc, qui a pour conséquences des changements des niveaux de glutamate, de transmission synaptique, de propriétés électrophysiologiques des MSNs et des changements comportementaux. Au cours de ma thèse, j'ai exploré comment les astrocytes influent sur tous ces paramètres. Nous allons donc nous intéresser aux divers rôles et propriétés astrocytaires déjà connues dans cette plasticité synaptique.

1.1. L'hypothèse de l'homéostasie au glutamate

Énoncée par Peter Kalivas il y a 10 ans (Kalivas, 2009), cette hypothèse stipule que les changements de plasticité entre le cortex préfrontal et le noyau accumbens induits par la cocaïne sont dus à des altérations des niveaux de glutamate à la synapse PFC-NAc. En effet, il énonce que la cocaïne réduit les niveaux d'expression membranaire de l'échangeur cystine-glutamate (xCT) astrocytaire (Baker et al., 2003), ce qui serait la cause d'une réduction de 50% du niveau extracellulaire du glutamate dans le NAc (Knackstedt, Melendez, & Kalivas, 2010; Madayag et al., 2007; Pendyam, Mohan, Kalivas, & Nair, 2009). Le glutamate extracellulaire libéré par les astrocytes via cet échangeur (cf. 1.2.3) est à l'origine de l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate de type 2 et 3 (mGluR2/3), qui eux-mêmes inhibent la libération synaptique de glutamate (Mitrano, Arnold, & Smith, 2008; Moran, McFarland, Melendez, Kalivas, & Seamans, 2005). Ainsi, cette baisse de concentration de glutamate extracellulaire pérисynaptique d'origine astrocytaire aurait pour conséquence une augmentation de la libération de glutamate à la synapse, et donc de la réponse postsynaptique, qui favoriserait la persistance d'un comportement de recherche de drogues (McFarland, Lapish, & Kalivas, 2003; Miguéns et al., 2008). Ce modèle énonce donc qu'après administration de cocaïne, la concentration de glutamate extracellulaire pérисynaptique est diminuée, tandis que celle du glutamate synaptique est augmentée, ce qui génère donc une dérégulation de l'homéostasie au glutamate (Figure 12). Dans cette théorie, nous voyons le rôle central des astrocytes, à l'origine de la dérégulation glutamatergique. Kalivas s'intéresse d'ailleurs tout particulièrement à leur rôle à cette synapse et a montré que l'utilisation d'un agoniste du transporteur xCT, la N-acétylcystéine (NAC) peut restaurer les niveaux de glutamate (Moran et al., 2005). De plus, des effets similaires sont observés avec l'utilisation du ceftriaxone, qui augmente l'expression des récepteurs GLT-1 astrocytaire, afin de permettre une plus rapide capture du glutamate synaptique (Knackstedt et al., 2010).

La théorie de Kalivas se fonde sur le fait que les astrocytes peuvent libérer du glutamate par les transporteurs xCT et donc influencer la plasticité synaptique, mécanisme complexe et varié (Schofield, 2018). Il est tout de même intéressant de se pencher sur les autres moyens qu'ont les astrocytes d'influencer la plasticité glutamatergique du NAc.

1.2. Modulation des autres récepteurs glutamatergiques

En plus des dérégulations des niveaux de xCT, la cocaïne réduit les niveaux d'expression du transporteur astrocytaire au glutamate principalement responsable de sa capture à la synapse, le GLT-1 (Pendyam et al., 2009). Récemment, il a été montré que le défaut de capture glutamatergique induit par la drogue dans le NAc n'est pas la cause du comportement de recherche de drogues, mais que le restituer peut inhiber ce comportement pathologique (Siemsen et al., 2019). Cependant, il est important de noter que cette étude a été faite sur la méthamphétamine et non de la cocaïne. Par ailleurs, une autre étude faite sur la cocaïne montre que le niveau d'expression des transporteurs GLT-1 a un lien direct avec la réponse locomotrice à la cocaïne (Shimamoto et al., 2018).

De plus, les récepteurs métabotropiques au glutamate astrocytaires ont un rôle majeur dans les effets de la transmission glutamatergique du NAc (D'Ascenzo et al., 2007; Fellin, D'Ascenzo, & Haydon, 2007), et il a été montré que bloquer ces récepteurs inhibait le comportement de recherche de cocaïne et la rechute (Xia Li et al., 2018).

Par ailleurs, la cocaïne a aussi pour effet de diminuer la signalisation contrôlée par les récepteurs métabotropiques au glutamate neuronaux et pérисynaptiques, les mGluR2/3, activés physiologiquement par l'excès de glutamate ou par celui libéré par les astrocytes (Mitrano et al., 2008; Moran et al., 2005; Xi et al., 2002). De plus, cet effet est renforcé par le fait que la cocaïne augmente l'action de l'« activator of G-protein signaling 3 » (AGS3), qui inhibe les fonctions des mGluR2/3 (Kalivas et al., 2003).

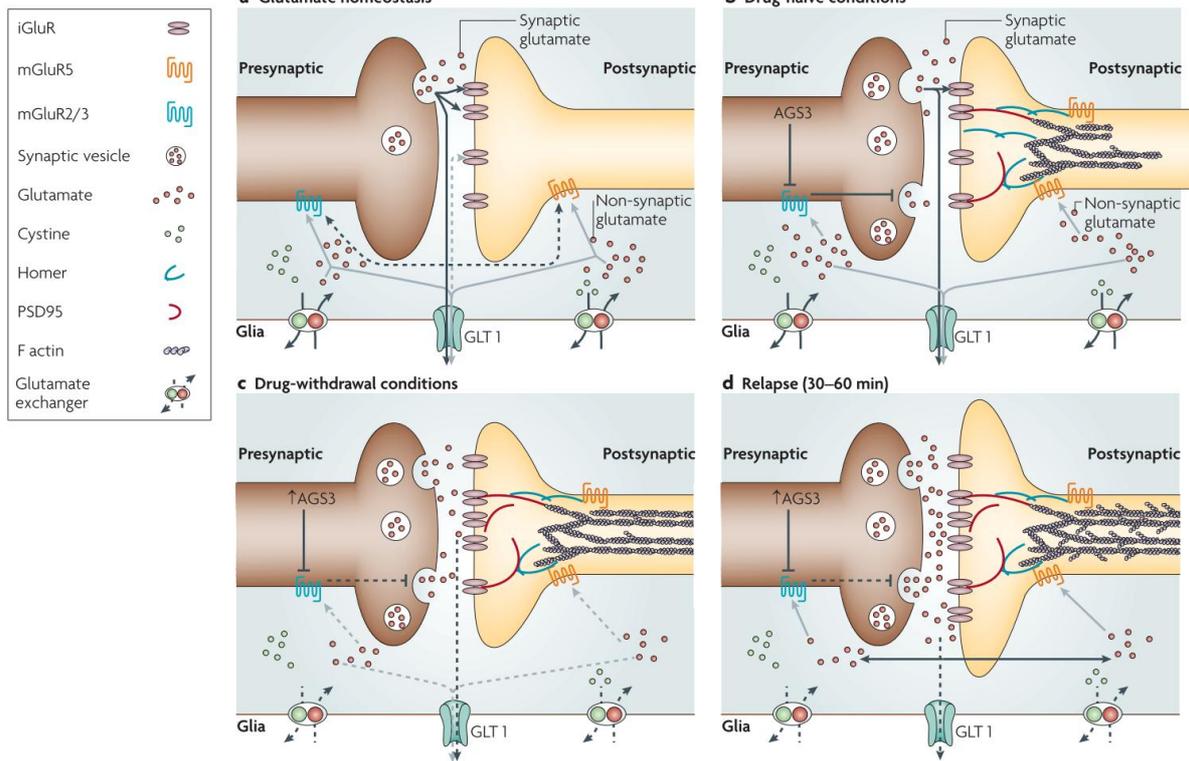


Figure 13 : Dérèglement de l'homéostasie du glutamate à la synapse PFC-NAc après administration de drogue. a. En condition d'homéostasie au glutamate, les transporteurs astrocytaires xCT libèrent du glutamate, qui active les récepteurs métabotropiques pré- et post-synaptiques mGluR2/3 et mGluR5. Le glutamate libéré par le neurone présynaptique active les récepteurs AMPA et NMDA (iGluR) à la surface postsynaptique, et est transporté par les transporteurs GLT1 astrocytaires. b. A la suite d'une primo-injection de drogue, les niveaux synaptiques de glutamate sont augmentés, ainsi que les niveaux pérисynaptiques. c. Lors du retrait de la drogue, une plasticité se met en place à la suite de la suractivation de la synapse, les niveaux pérисynaptiques du glutamate sont plus faibles d'où la diminution de l'activation des récepteurs mGluR2/3 et donc de l'inhibition de la libération présynaptique de glutamate. d. Lors de la rechute, la libération de glutamate à la synapse, toujours désinhibée, est amplifiée, ainsi les niveaux de glutamate synaptiques et pérисynaptiques sont drastiquement différents de ceux observés dans le panel a., et la réponse post-synaptique n'en est que d'avantage augmentée. *D'après Kalivas, 2009.*

2. RÔLE DES ASTROCYTES DANS LA SYNAPTOPATHIE DOPAMINERGIQUE

Le circuit de la récompense, après action de la cocaïne, est grandement modifié (cf. chapitre II, 3). Les zones impliquées dans ce circuit sont les mêmes, il n'y a pas de dégénérescence cellulaire comme dans le cas des maladies neurodégénératives, mais les connexions entre ces aires cérébrales sont altérées. C'est ce que l'on appelle une synaptopathie, c'est à dire une pathologie due à un défaut de transmission neuronale.

Dans le cas de l'addiction, et particulièrement de celle à la cocaïne, le défaut de transmission dopaminergique est le premier acteur mis en cause, notamment dans le NAc (cf. II.3.2). En effet, il a été montré que les augmentations de niveau de dopamine dans le NAc étaient directement liés au comportement de recherche de drogues chez les souris (Koob & Bloom, 1988; McGregor & Roberts, 1993). De plus, l'application d'agonistes des récepteurs à la dopamine dans le NAc (D₁ et D₂) induit un comportement similaire à celui de recherche de drogues, prouvant le lien entre l'action de la dopamine et la mise en place d'un comportement adaptatif (Weissenborn, Deroche, Koob, & Weiss, 1996). Ces augmentations des niveaux de dopamine dans le NAc affluent de la VTA sous forme de vagues transitoires (Aragona et al., 2008; Carelli, 2004; Heien et al., 2005). D'ailleurs, en plus de son action sur la capture de la dopamine dans le NAc, il a été identifié que la cocaïne pouvait directement stimuler les neurones dopaminergiques de la VTA (Mejias-Aponte, Ye, Bonci, Kiyatkin, & Morales, 2015). Ainsi, l'addiction à la cocaïne peut être perçue comme une synaptopathie dopaminergique.

Récemment, les astrocytes ont été impliqués dans la communication dopaminergique. Il a d'abord été montré *in vitro* un lien indirect entre les mécanismes de relargage de dopamine et les astrocytes dans un modèle d'ischémie (Oliva, Fernández, & Martín, 2013). En effet, cette étude montre qu'en condition d'ischémie, les transporteurs astrocytaires à la dopamine peuvent s'inverser et relarguer de la dopamine dans le milieu extracellulaire, contribuant ainsi à l'augmentation de la mort neuronale. Une autre étude montre que la diminution des niveaux de dopamine modifie les niveaux d'expression des transporteurs glutamatergiques astrocytaires (Vollbrecht, Simmler, Blakely, & Deutch, 2014). En effet, dans cette étude les auteurs montrent qu'une déplétion de la dopamine dans le cortex préfrontal augmente l'expression des transporteurs GLT1 astrocytaires. Augmentation qui a d'ailleurs plus tard aussi été observée dans le NAc (Shimamoto et al., 2018). Ce phénomène peut être partiellement expliqué par l'effet direct de la dopamine sur l'expression des transporteurs glutamatergiques astrocytaires via le mécanisme du trace amine-associated receptor 1-excitatory amino acid transporter 2 (TAAR1-EAAT2), proposé quelques années plus tard (Wen, Liu, Xu, Yang, & Ding, 2017). Ce mécanisme stipule qu'en présence de dopamine, les niveaux d'expression d'EAAT2 astrocytaires (gène codant pour le canal GLT1) étaient diminués tandis que les niveaux de TAAR1 étaient augmentés, ayant pour effet une augmentation de la capture du glutamate. Ainsi, les auteurs concluent que la dopamine modifie les niveaux de capture du glutamate via la signalisation TAAR1-EAAT2. Une autre étude intéressante a montré que la dopamine induit une inversion fonctionnelle du transporteur à la glycine astrocytaire (GlyT1), résultant en un relargage de glycine par les astrocytes (Shibasaki, Hosoi, Kaneko, Tominaga, & Yamada, 2017). De même, la dopamine peut induire une libération de BDNF par les astrocytes (Koppel et al., 2018). En somme, les changements de niveau de dopamine modifient les propriétés des astrocytes, mais il est

intéressant de comprendre le rôle que ces derniers pourraient avoir sur la transmission dopaminergique.

Au début des années 2000, une protéine, le cluster de différenciation 81 (CD81), exprimée par les astrocytes et impliquée dans l'adhésion cellulaire, a été reliée à la sensibilisation à la cocaïne chez la souris. En effet, les souris déficientes en CD81 présentent une diminution de la sensibilisation à la cocaïne, évaluée par le test de la préférence de place (Michna et al., 2001). Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas élucidés. Une dizaine d'années plus tard, un nouveau mécanisme astrocytaire a été mis en évidence : la transmission cannabinoïde. Il a été montré que les astrocytes et neurones accumbaux co-exprimaient les récepteurs aux endocannabinoïdes CB2 et les récepteurs à la dopamine D2R. Comme les récepteurs CB2 sont impliqués dans la réponse motrice à la cocaïne, l'hypothèse d'une interaction de ces récepteurs avec la transmission dopaminergique est soulevée (Aracil-Fernández et al., 2012). Par ailleurs, une étude récente a montré que l'activation des récepteurs au glucagon-like peptide-1 (GLP-1) réduit les hausses de concentration de dopamine dans le noyau accumbens ainsi que la réponse locomotrice induite par la cocaïne. Ces récepteurs sont présents à la surface des neurones et astrocytes du noyau accumbens, et leur activation à l'aide d'un agoniste injecté lors de la phase de retrait de la drogue, réduit la rechute en comportement de recherche de drogues. De plus, les auteurs montrent des modifications d'excitabilité intrinsèque des MSNs du NAc, et prouvent la spécificité de ce mécanisme à la plasticité induite par la cocaïne (en comparaison à une autre drogue, en l'occurrence le sucre). Ainsi, les auteurs montrent que la signalisation induite par l'activation des récepteurs GLP-1 astrocytaires et neuronaux dans le NAc module la réponse dopaminergique et comportementale induite par la cocaïne (Hernandez, O'Donovan, Ortinski, & Schmidt, 2019).

En conclusion, la dopamine peut moduler la transmission synaptique du NAc via les astrocytes, et les astrocytes peuvent aussi influencer sur les niveaux dopaminergiques et leur résultante comportementale.

3. AUTRES MODIFICATIONS ASTROCYTAIRES INDUITES PAR LA COCAÏNE

Au-delà des récepteurs et transporteurs du glutamate et de la dopamine, les astrocytes peuvent influencer de plusieurs autres manières la transmission glutamatergique induite par la cocaïne.

Une des pistes prometteuses de la littérature de ces dernières années, est celle d'explorer les changements intrinsèques astrocytaires opérés à la suite d'administration de cocaïne. Des changements morphologiques auraient lieu dans le noyau accumbens (cf. Chapitre II, 3.2.2). De plus, il a été montré que la cocaïne augmente les niveaux d'expression de l'aquaporine 4 (AQP4), le transporteur aqueux astrocytaire. Cette étude montre une altération à la réponse locomotrice induite par la cocaïne et des changements de niveaux de dopamine et glutamate dans le NAc de souris déficientes en AQP4 (Z. Li et al., 2006).

Enfin, il est important de noter qu'une étude a montré que la cocaïne augmentait les niveaux d'ARN d'interleukine 1 β (IL-1 β), une cytokine qui peut induire une réactivité astrocytaire (cf. chapitre I.5.) (Cearley, Blindheim, Sorg, Krueger, & Churchill, 2011). En conditions de réactivité, les astrocytes ont le potentiel de réguler l'homéostasie au

glutamate, ce qui implique un rôle potentiel de la réactivité astrocytaire dans les mécanismes de modifications de transmission glutamatergique (Coulter & Eid, 2012).

Au cours de ma thèse, les mécanismes de réactivité astrocytaire ont été explorés, notamment à la suite d'injection de cocaïne.

Objectifs de l'étude

Cette étude a plusieurs objectifs. Nous proposons ici d'étudier les mécanismes potentiels par lesquels les astrocytes pourraient réguler les fonctions neuronales en conditions aussi bien physiologiques que pathologiques.

Objectif 1 : Déterminer l'influence de la signalisation calcique des astrocytes sur leur morphologie et couverture synaptique

Le calcium étant le messager principal de la communication astrocytaire, les signaux calciques astrocytaires ont été très étudiés dans leur influence sur la neurotransmission (Papouin, Dunphy, Tolman, Foley, & Haydon, 2017). Ainsi, le rôle des signaux calciques astrocytaires dans la neurotransmission est principalement étudié par le biais d'inhibition de la signalisation Ca⁺ astrocytaire. Par ailleurs, nous savons que la morphologie astrocytaire est aussi fortement impliquée dans la neurotransmission (Allen, 2014; Iino et al., 2001; Oliet et al., 2001; Pannasch et al., 2014) et dépend du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire connus pour être régulés par le calcium intracellulaire dans de nombreux types cellulaires (Grimaldi, Favit, & Alkon, 1999; Heimfarth et al., 2016). Dans ce projet, nous avons donc investigué si les modifications de calcium intracellulaire engendrent des changements de morphologie astrocytaire et de couverture des synapses, qui pourraient ainsi aussi modifier la neurotransmission.

Objectif 2 : Etudier le rôle des astrocytes dans les mécanismes de sensibilisation à la cocaïne dans le NAc

Les astrocytes ont été mis en cause dans les circuits de l'addiction à la cocaïne, notamment avec la théorie de l'homéostasie au glutamate (Kalivas, 2009). En effet, les mécanismes de l'addiction sont dépendants d'un défaut de transmission glutamatergique, notamment dans le NAc. Or nous avons montré dans le laboratoire que les astrocytes contribuent à la transmission et plasticité des synapses glutamatergiques par des mécanismes de plasticité structurale impliquant des changements de morphologie et de couverture des synapses sous-tendus par la Cx30 (Pannasch et al., 2014). Ici, nous avons donc investigué le rôle de la Cx30 dans les mécanismes de l'addiction. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de la sensibilisation à la cocaïne. Nous avons d'abord recherché si les astrocytes, via la Cx30, contribuent à des modifications comportementales induites par la cocaïne. Nous avons ensuite étudié l'effet de la cocaïne sur les propriétés structurales des astrocytes dans le NAc et l'expression de marqueurs clés associés. Enfin nous avons recherché l'influence de la Cx30 dans les neurotransmissions glutamatergique et dopaminergique induites par la cocaïne.

Objectif 3 : Etablir si un lien existe entre la réactivité astrogliale et la Cx30

Lors du projet précédent, et d'autres projets réalisés au laboratoire, nous avons noté un lien entre l'expression de la Cx30 et la réactivité astrocytaire. En effet, nous avons remarqué que l'expression de la Cx30 est systématiquement augmentée en conditions

réactives. Ainsi, en utilisant différents modèles de réactivité astrocytaire, et différentes méthodes de manipulation de la Cx30, nous avons étudié le lien entre la réactivité astrocytaire et la Cx30.

En conclusion, notre but ici a été d'élucider un peu plus les différents aspects par lesquels les astrocytes pourraient influencer la transmission neuronale, en utilisant différents modèles et différentes pathologies.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

PARTIE I : MATÉRIEL

1. PRODUITS CHIMIQUES

1.1. Anticorps

| Anticorps | Cible | Espèce | Type | Clonalité | Concentration | Entreprise |
|---------------------------------------|------------------------|--------|--|-----------|---------------|------------|
| Cx30 | Cx30 | Lapin | Primaire | Mono | 1 : 500 | Abcam |
| GFAP | Astrocytes | Souris | Primaire | Mono | 1 : 500 | Abcam |
| Iba1 | Microglie | Lapin | Primaire | Mono | 1 : 500 | Abcam |
| GFP | GFP | Poulet | Primaire | Poly | 1 : 500 | Aves |
| STAT3 | STAT3 | Souris | Primaire | Mono | 1 : 500 | Abcam |
| Vimentine | Vimentin | Chèvre | Primaire | Poly | 1 : 250 | |
| Anti lapin – Alexa 488/555/647 | Anticorps de lapin | Chèvre | Secondaire couplé à un fluorophore | Poly | 1 : 2000 | Abcam |
| Anti souris – Alexa 488/555/647 | Anticorps de souris | Chèvre | Secondaire couplé à un fluorophore | Poly | 1 : 2000 | Abcam |
| Anti poulet – Alexa 488 | Anticorps de poulet | Chèvre | Secondaire couplé à un fluorophore | Poly | 1 : 2000 | Abcam |
| Anti-chèvre – Alexa 488 | Anticorps de chèvre | Âne | Secondaire couplé à un fluorophore | Poly | 1 : 2000 | Abcam |

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés

1.2. Autres kits et produits chimiques

La cocaïne (cocaïne hydrochloride, Sigma Aldrich, C5776, 1 gramme) est diluée dans de la solution saline (NaCl 0,9% dans H₂O) et injectée en intrapéritonéal (I.P.) à 10mg/kg. L'utilisation de ce stupéfiant est soumise à une autorisation de l'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de la santé (ANSM) n° A-2016-9-2429-S.

L'amphétamine (d-amphétamine) est diluée dans de la solution saline (NaCl 0,9% dans H₂O) et injectée en I.P. à 2mg/kg).

Le kaïnate (acide kaïnique, Sigma Aldrich) était dilué dans du PBS pour obtenir une concentration de 20µM. Il est ensuite injecté de manière intrahippocampale (cf. Partie II.3 pour les méthodes).

2. INJECTIONS INTRACEREBRALES

2.1. Matériel pour la chirurgie

Les animaux sont anesthésiés avec un mélange de kétamine (95mg/kg, Merial) et xylazine (10mg/kg, Bayer) dans une solution 0,9% NaCl, puis placés dans un stéréotaxe avec une régulation constante de la température corporelle. L'injection intracérébrale se pratique à l'aide d'une seringue Hamilton (Phymep) équipée d'une canule à bout émoussé de calibre 29.

2.2. Vecteurs viraux

Pour l'étude de la réactivité, nous avons eu recours à différents vecteurs viraux. Les vecteurs viraux suivants ont été développés et fournis par Dr. Alexis Bemelmans (CEA, Intitut François Jacob, Fontenay-aux-Roses, France) :

AAV-GFP : pAAV9 GFA-ABC1D-GFP

AAV-GFP-Cx30 : pAAV9 GFABGLOB-GFP-Cx30

Les vecteurs viraux suivants ont été développés et fournis par Dr. Carole Escartin (CEA, Intitut François Jacob, Fontenay-aux-Roses, France) :

AAV-JAK2 : pAAV2/9 GFA-ABC1D-JAK2ca

AAV-SOCS3 : pAAV2/9 GFA-ABC1D-SOCS3

Les vecteurs viraux AAV sont dilués dans du PBS 0,1 M, avec BSA 1% et acide pluronique 0,001%, pour atteindre une concentration d'environ 1×10^{13} vg/ml, et le volume injecté était d'1µL.

3. ELECTROPHYSIOLOGIE

Les tranches coronales aiguës de 350µm ont été découpées à l'aide d'un vibratome (Leica, Allemagne) dans de l'aCSF à 0°C composé de (en mM) 119 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃ et 11 glucose, (230-235 mOsm) saturé de 95% O₂ et 5% CO en continu. Les tranches individuelles sont ensuite transférées dans une chambre thermorégulée à 32.5°C (Badcontroller V; Luigs & Neumann), placée sous un microscope (Axioscop2FS; Zeiss) équipé d'une camera CCD infrarouge (CoolSNAP HQ²; Roper Scientific). Les tranches sont maintenues immergées dans de l'aCSF oxygéné contenant de la picrotoxine (100µM). Toutes les expériences d'électrophysiologie ont été faites à l'aide d'un amplificateur MultiClamp700B (Molecular Devices, Etats-Unis) connecté à une interface d'acquisition (Digidata 1440; Molecular Devices, Etats-Unis) reliée à un ordinateur opérant le logiciel pCLAMP (Molecular Devices, Etats-Unis).

Les MSNs étaient patchés avec des électrodes (4-8 MΩ) contenant une solution intracellulaire composée de (en mM) : 117 mM césium gluconate, 2.8 mM NaCl, 20 mM HEPES, 0.4 mM EGTA, 5 TEA-Cl, 2.5 MgATP, and 0.25 MgGTP, pH 7.2-7.4 (285-295 mOsm) + biocytine (4mg/mL). Pour le calcul de l'activation spontanée des récepteurs NMDA, du (RS)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP, 10 µM) est ajouté à l'aCSF. Pour le calcul des niveaux de glutamate synaptique libéré, du gamma-D-Glutamylglycine (γ-DGG, 100µM) est ajouté à l'aCSF.

4. ACTIVITE LOCOMOTRICE

Pour les expériences d'activité locomotrice, nous avons utilisé des openfield de 50*50*38cm en PVC blanc opaque, faits sur mesure (Solutions Exposition, France). Les

distances parcourues par les animaux sont mesurées en *live* à l'aide du logiciel Any-maze (Ugo Basile, France). Les expériences sont effectuées dans une salle prévue à cet effet au sein de l'animalerie du CIRB.

Le tracé des chemins parcourus a été réalisé a posteriori avec le logiciel Ethovision XT (Noldus, Pays-Bas).

Pour l'activité locomotrice calculée après injections d'amphétamine, la société Key-Obs (Orléans, France) a utilisé un couloir circulaire relié à une interface électronique qui assure la mise en forme des signaux issus des capteurs infra-rouges et permet la communication avec l'ordinateur.

5. LIGNEES TRANSGENIQUES

Les lignées de souris suivantes ont été utilisées :

- sauvages ou WT : C57BL/6J de Janvier labs (France) ou élevés au sein de l'animalerie du CIRB.

- Cx30 Δ/Δ ou Cx30 $-/-$: délétion constitutive de la Cx30, lignée générée et élevée au sein de l'animalerie du CIRB (A.-C. Boulay et al., 2013). Ces souris présentent une déficience totale en Cx30 de manière homozygote, elles n'ont donc pas de frères ou sœurs de portée négatives pouvant servir de contrôle.

- Cx30^{T5M/T5M} : mutation thréonine-méthionine en position 5 sur le gène encodant pour la Cx30, résultant en une délétion des fonctions canal de la Cx30. Générées initialement par le laboratoire du Dr. F. Mammano (Venetian Institute of Molecular Medicine, Italie) (Schütz et al., 2010), ces souris ont ensuite été élevées au sein de l'animalerie du CIRB.

- IP3R2 $-/-$: délétion constitutive du récepteur 2 des IP3, fournies par le laboratoire du Dr. J. Chen (Université de Californie de San Diego, La Jolla, Etats-Unis) (Xiaodong Li et al., 2005), puis élevées au sein de l'animalerie du CIRB.

- GFEC : protéine verte fluorescente renforcée (enhanced green fluorescent protein, eGFP) exprimée sous le contrôle du promoteur GFAP, générées dans le laboratoire du Dr. H. Kettenmann (Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Allemagne) (Nolte et al., 2001), puis élevées au sein de l'animalerie du CIRB.

Toutes ces lignées sont générées sur fond C57BL/6J et toutes les souris utilisées au cours de ces expériences étaient des mâles adultes (de 2 à 6 mois).

6. MICROSCOPIE ET LOGICIELS

6.1. Images et analyses d'images

Les images d'immunohistochimie ont été acquises par un microscope confocal à fluorescence inversé SP5 (Leica, Allemagne), en utilisant un objectif 63x.

Les analyses d'images ont été faites sur les logiciels Fiji et ImageJ (National Institute of Health, Etats-Unis). Le plugin « concentric circles » (cercles concentriques) d'ImageJ a été utilisé pour effectuer les analyses de Sholl.

Les analyses de couverture synaptique ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal à super-résolution équipé de la technologie STED (Abberior, Allemagne)

6.2. Autres logiciels

Tous les graphiques et analyses statistiques ont été effectués sur le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Etats-Unis). Les figures ont été mises en page sur Adobe Illustrator (Adobe, Etats-Unis), en utilisant parfois des schémas faits sur le site Biorender (Biorender, Canada).

PARTIE II : MÉTHODES

1. SENSIBILISATION A LA COCAÏNE

Le protocole de sensibilisation à la cocaïne (ou à l'amphétamine) consiste en une injection quotidienne de cocaïne (10mg/kg pour la cocaïne, 2mg/kg pour l'amphétamine) pendant 5 jours consécutifs. Le tissu est ensuite récupéré 24h après la dernière injection, et analysé en Immunohistochimie ou Immunoblot.

Dans les expériences de mesure de l'activité locomotrice, les animaux reçoivent une injection supplémentaire, 10 jours après la dernière, soit au jour 15. Cette injection sert à tester la plasticité sur le long-terme et est appelée « injection challenge ».

Dans le cadre des expériences d'électrophysiologie, les mesures sont effectuées 10 à 15 jours après la dernière injection, soit entre les jours 15 et 20, mais cette fois sans injection challenge au préalable.

2. IMMUNOHISTOCHIMIE ET IMMUNOBLLOT

Les expériences d'immunohistochimie et d'immunoblot ont été faites comme décrites précédemment (Koulakoff, Ezan, & Giaume, 2008; Pannasch et al., 2011).

Pour les acquisitions d'immunohistochimie, au moins 4 champs par animal étaient acquis, sur minimum deux tranches distinctes. Sur un champ, un empilement Z à l'objectif 63x était effectué, d'une épaisseur d'environ 30µm avec un pas d'1µm. Les paramètres d'acquisitions sont strictement conservés entre les différentes tranches des différents animaux des différentes conditions.

Les mesures d'intensité de fluorescence ont été faites sur une image de projection maximale de l'intensité en Z. Environ 5 régions d'intérêt (ROI, *region of interest*) ont été tracées dans des zones contenant des astrocytes sur cette image, et l'intensité de fluorescence a été calculé dans ces ROIs. Les mesures présentées correspondent à la moyenne de l'intensité de fluorescence de toutes les ROIs d'une même condition.

Les calculs de couverture synaptique ont été effectués en utilisant la même méthode que décrite dans l'Article en Partie I des Résultats.

3. INJECTIONS INTRACEREBRALES STEREOTAXIQUES

Les expériences ont été réalisées en accord avec les directives du Conseil de la Communauté européenne du 1er janvier 2013 (2010/63/EU) et du comité d'éthique (certificat A751901, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche), sous le projet n°2017121113344876, et tous les efforts ont été mis en place pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et diminuer leur souffrance.

L'animal est anesthésié puis placé dans un stéréotaxe. Après incision de la peau, les coordonnées précises sont mesurées à partir de bregma et des trous sont effectués dans le crâne à l'aide d'une foreuse de précision chirurgicale.

Les injections intra-hippocampales ont été faites en utilisant les coordonnées suivantes (par rapport à bregma) : antéro-postérieur : -2mm ; médio-latéral : ±1,5 mm ; dorso-ventral : -1,35mm. Les injections de 1µL sont faites à une vitesse de 0,2µL/min. Puis la canule est laissée 5 minutes dans le tissu avant de la remonter très lentement. La peau est

rattachée à l'aide de colle chirurgicale et l'animal est positionné dans un sas de réveil chauffé. Il est ensuite surveillé quotidiennement jusqu'à prélèvement des tissus.

Nous avons utilisé des injections intra-hippocampales selon les modalités et coordonnées précédemment décrites. Nous avons injecté des vecteurs viraux (cf. Matériel 2.2), et prélevé le tissu trois semaines après injections.

Le modèle de blessure *in vivo* a été effectué à l'aide d'une canule disposée d'un injecteur intracérébral stéréotaxique, comme pour une injection de vecteurs viraux mais avec une canule vide. Le tissu est prélevé deux à trois semaines après la blessure.

L'injection de kaïnate a aussi été faite selon les mêmes modalités. Le tissu a été prélevé une semaine après l'injection intra-hippocampale de kaïnate. Le kaïnate était injecté à une concentration de 20 μ M, à un volume de 0.05 μ L, avec une vitesse de 0.05 μ L/min.

4. ELECTROPHYSIOLOGIE

Deux électrodes sont placées dans des tranches coronales aiguës, une électrode de stimulation (4-8 M Ω) et une autre électrode de patch (4-8 M Ω), en configuration de cellule entière dans un MSN.

Pour l'acquisition des courants miniatures post-synaptiques excitateurs (mEPSCs), le potentiel est maintenu à -70mV et aucune stimulation n'est implémentée. Pour le calcul de l'effet du CPP (20 μ M), un antagoniste des récepteurs NMDA, le potentiel est maintenu à +40mV et les courants toniques NMDA sont mesurés. Pour le calcul du pourcentage d'inhibition de l'amplitude par le γ -DGG, le potentiel est maintenu à -70mV et une stimulation est implémentée. Une vingtaine de sweeps est mesurée avant d'introduire le γ -DGG (100 μ M) dans l'aCSF. Après 8 minutes (environ 100 sweeps), une vingtaine de sweeps est à nouveau mesurée. La soustraction des moyennes des sweeps avant et après nous permet de calculer le pourcentage d'inhibition induit par le γ -DGG.

5. MESURE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE

Lors du protocole de sensibilisation à la cocaïne, l'activité locomotrice des animaux est calculée à l'aide d'un logiciel de tracking dans un openfield. L'activité locomotrice est mesurée 30 minutes avant les injections de cocaïne ou solution saline et 2 fois 30 minutes après l'injection. Les résultats montrés ici correspondent à l'activité locomotrice mesurée lors des 30 premières minutes suivant l'injection.

RESULTATS

PARTIE I : LE CALCIUM INTRACELLULAIRE CONTROLE LA MORPHOLOGIE ASTROCYTAIRE ET LA COUVERTURE SYNAPTIQUE

La signalisation calcique est reconnue comme une propriété clé des astrocytes (Schummers et al., 2008) sous-tendant leur « excitabilité » et leur régulation de la transmission et plasticité synaptique (Takata et al., 2011). Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore bien élucidés. En effet, si le rôle de la signalisation calcique dans la gliotransmission est aujourd'hui admis (Agulhon et al., 2012; Navarrete et al., 2013; Santello, Cali, & Bezzi, 2012), cette signalisation calcique pourrait aussi être impliquée dans d'autres fonctions astrocytaires jouant également un rôle important dans la transmission synaptique. Etant donné que dans de nombreux types cellulaires, le cytosquelette et l'adhésion cellulaire sous-tendant la morphologie des cellules peuvent être régulés par le calcium intracellulaire (Cotrina, Lin, & Nedergaard, 2008; Heimfarth et al., 2016) et que la morphologie des astrocytes est fortement impliquée dans la neurotransmission (Iino et al., 2001; Oliet et al., 2001; Pannasch et al., 2014), nous avons ici investigué si la signalisation calcique astrocytaire régule leur morphologie et couverture des synapses. Pour ce faire nous avons employé plusieurs techniques classiquement utilisées dans la littérature depuis une vingtaine d'années pour altérer les signaux calciques intracellulaires afin de déterminer si ces manipulations classiques induisent également des changements de morphologie et de couverture synaptique.

Calcium signaling controls astrocyte morphology and synapse coverage

Anna Capano^{1,2‡}, David Mazaud^{1‡}, Jonathan Zapata¹, Philippe Mailly¹, Nathalie Rouach^{1*}

¹Neuroglial Interactions in Cerebral Physiology, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS UMR 7241, INSERM U1050, Labex Memolife, PSL

²Doctoral School N°158, Pierre and Marie Curie University, Paris, France.

‡Equal contributing authors

*Correspondence to: nathalie.rouach@college-de-france.fr

CIRB, CNRS UMR 7241/INSERM U1050, Collège de France, 11 place Marcelin Berthelot 75005

Paris France

Tel: 00 33 1 44 27 14 49

Abstract

Astroglial calcium signaling is thought to play a key role in modulating synaptic activity via the release of neuroactive factors. Until now, this has been repeatedly reported by disrupting calcium signaling using knockout mice for IP3-receptor-type-2 or acutely chelating calcium in astrocytes. Here we show using confocal and super-resolution microscopy that these classic manipulations also alter the morphology of hippocampal astrocytes and their coverage of synapses, two key neuromodulatory features.

Astrocytes are the major glial type of the brain and play crucial roles in neuronal activity¹. They are morphologically complex cells with numerous fine processes forming bushy structures that contact thousands of synapses². They sense neuronal inputs through their ion channels, transporters or membrane receptors and respond by transduction pathways. They can modulate in turn neighboring pre- and postsynaptic elements by various mechanisms, such as uptake or release of neuroactive factors, contact-mediated signaling or plastic physical coverage of neurons³. Although not electrically excitable, astrocytes are dynamic and motile signaling elements^{4, 5} that exhibit particularly complex intracellular calcium signals, which have been extensively studied in the last 30 years⁶. Calcium signaling is notably admitted as one of the main feature of astrocytes regulating synaptic transmission and plasticity. This calcium-dependent modulation of synaptic function is currently thought to be primarily mediated by astroglial release of neuroactive factors, or so-called gliotransmitters⁷, although some controversy exists⁸. In most cell types, calcium is however a ubiquitous signal, which contributes to nearly all aspects of cell biology, including gene expression, cell metabolism or motility⁹. Since cell cytoskeleton and adhesion can be regulated by intracellular calcium^{10, 11} and the morphology of astrocytes modulates neurotransmission^{12, 13}, we here investigated *in situ* whether altering astroglial calcium signaling directly modifies hippocampal astrocyte morphology and coverage of synapses. To do so, we used molecular and pharmacological approaches extensively used in the literature to alter calcium signaling either chronically and locally in the soma, via deletion of IP3 receptors type 2 in knockout mice¹⁴⁻¹⁶, or acutely and throughout the whole astrocyte via chelation of intracellular calcium (with BAPTA or EGTA)^{17, 18}, respectively.

We first investigated whether intracellular calcium signaling regulates the morphology of astrocytes. To characterize astrocyte morphology in these different experimental paradigms, we dialysed single astrocytes from hippocampal slices with the Alexa-488 fluorescent dye (0.17 mM, 20 min) using the whole cell configuration of the patch clamp technique (Fig. 1a). We then performed confocal imaging and three-dimensional reconstructions of individual labeled astrocytes (Fig. 1a) to analyze several structural features of astrocytes morphology. Here we systematically compared the morphology of wild type astrocytes (Control) to the one of IP3R2^{-/-} astrocytes and wild type astrocytes with acute calcium chelation (BAPTA or Ca-Clamp, 20 min).

Remarkably, we found that the soma size of astrocytes from IP3R2^{-/-} mice was significantly increased, by ~40 %, compared to the one of wild type astrocytes (IP3R2^{-/-}: 90.22±9.06 μm², n=6 vs Control: 60.06±2.97 μm², n=8, p=0.008, ANOVA (p=0.0063) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1b). In contrast, acute chelation of intracellular calcium by BAPTA or Ca-Clamp solution had no effect in wild type astrocytes (BAPTA, 64.91±7.13 μm², n=7, p=0.9327; Ca-Clamp, 61.54±4.47 μm², n=8, p=0.9976, ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1b). Similarly we found that the domain area of astrocytes, i.e. the area occupied by the whole astrocyte, was higher in IP3R2^{-/-} mice compared to wild type mice (IP3R2^{-/-}: 4946±372.8 μm², n=6 vs Control: 3187±261.4 μm², n=8, p=0.0395, ANOVA (p=0.0349) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test), while there was no change in the domain area of wild type astrocytes with calcium chelation (BAPTA, 3244±273.2 μm², n=6, p=0.9997; Ca-Clamp, 4001±608.5 μm², n=8, p=0.4911, Fig. 1c).

We then analysed the structural features at the level of astroglial processes. We found that the total volume of astroglial processes was higher in wild type astrocytes with calcium chelation compared to control astrocytes, while IP3R2^{-/-} astrocytes were unchanged (Control: 47.8±5.4 μm³, n=7; BAPTA: 484.1±69.4 μm³, n=7, p<0.001; Ca-Clamp=249.4±43.9 μm³, n=6, p=0.0194; IP3R2^{-/-}: 99.15±21.06 μm³, n=6, p=0.8528, One-way ANOVA (p<0.0001) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1d). Furthermore, astrocytes chelated with BAPTA had a higher total process volume than astrocytes chelated with the Ca-Clamp solution (p=0.0058, Tukey's post-hoc test, Fig. 1d). To investigate the basis for this increase in total process volume of calcium-chelated astrocytes, we analysed the diameter and total length of astrocyte processes. We found that only astrocytes chelated with BAPTA exhibited increased process diameter compared to control astrocytes (Control: 0.24±0.009 μm, n=6;

BAPTA: $0.503 \pm 0.045 \mu\text{m}$, $n=7$, $p=0.0017$; Ca-Clamp= $0.356 \pm 0.027 \mu\text{m}$, $n=7$, $p=0.1132$; IP3R2^{-/-}: $0.303 \pm 0.026 \mu\text{m}$, $n=6$, $p>0.99$, Kruskal Wallis ($p=0.002$) with Dunn's multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1e). However, calcium-chelated astrocytes with either BAPTA or Calcium-Clamp solution both displayed an increase in total length of processes, while IP3R2^{-/-} astrocytes were unchanged (Control: $952.9 \pm 122.6 \mu\text{m}$, $n=8$; BAPTA = $3116 \pm 809.8 \mu\text{m}$, $n=7$, $p=0.0246$; Ca-Clamp= $3071 \pm 589.8 \mu\text{m}$, $n=7$, $p=0.0284$, IP3R2^{-/-}: $1197 \pm 198.4 \mu\text{m}$, $n=6$, $p=0.9870$, One-way ANOVA ($p=0.006$) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1f). Such increase in processes total length of calcium-chelated astrocytes (BAPTA and Calcium-Clamp solution) results from a significantly higher number of small processes, with lengths ranging from 1.5 to 4.5 μm , compared to control astrocytes (Control, $n=8$; IP3R2^{-/-}, $n=6$; BAPTA, $n=7$; Ca-Clamp, $n=7$; 1.5 μm : BAPTA, $p<0.0001$; Calcium-Clamp, $p<0.0001$; 2.5 μm : BAPTA, $p<0.0001$; Calcium-Clamp: $p<0.0001$; 3.5 μm : BAPTA, $p<0.0001$; Calcium-Clamp, $p<0.0001$; 4.5 μm : BAPTA, $p=0.0021$; Calcium-Clamp, $p=0.0272$; Two-way ANOVA ($p<0.0001$) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1g). Finally, to further assess the changes in the distribution and complexity of astroglial processes induced by impairing calcium signaling, we analysed the ramification and branching complexity of astroglial processes. Consistent with the results found on the increased total length of processes due to a higher number of small processes in calcium-chelated astrocytes, we found that astrocytes chelated with BAPTA or the Ca-Clamp solution are more ramified at the proximal level, i.e. at short distances from the soma (10-15 μm), compared to control astrocytes, as revealed by Sholl analysis (Control, $n=8$; BAPTA, $n=7$, Ca-Clamp, $n=8$; Two-way ANOVA with repeated measures ($p=0.0287$) and Neuman-Keuls multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1h). In addition, their processes also display higher branching levels (Two-way ANOVA ($p=0.0061$) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1i). Remarkably, these analyses of processes distribution and complexity also reveal that IP3R2^{-/-} astrocytes are more ramified at both proximal and distal levels from the soma (Two-way ANOVA with repeated measures ($p=0.0287$) and Neuman-Keuls multiple comparisons post-hoc test, Fig. 1h). Such increased process ramification likely contributes to the increased domain area of IP3R2^{-/-} astrocytes (Fig. 1c). Altogether, these data indicate calcium signaling contribute to key features of astroglial morphology. Acute calcium chelation indeed strongly alters several structural aspects of astrocytes, including the total length and volume of their processes, as well as the complexity of their branching. These astrocytes become more bushy and display

a higher number of short processes proximally, near to the soma (Fig. 1a). However, it should be noted that calcium chelation with BAPTA has slightly stronger effects than the Ca-Clamp solution regarding those mentioned features, most likely due to its additional effect on astroglial process diameter. Furthermore, astrocytes deficient for IP3R2 are also altered in their morphology, although differently as they mostly exhibit a bigger soma size and domain area, most likely because of the more developed branching they exhibit distally from the soma.

In the hippocampus, astroglial processes are found in close proximity to excitatory synapses^{19, 20} and a change in their morphology can translate into altered synapse coverage¹³. Thus we next investigated whether the changes in astrocyte morphology induced by impaired calcium signaling modify the proximity of astrocytic processes to neighboring synapses. To this aim, we used super-resolution multicolor STED microscopy to precisely identify synaptic localization and assess their distances to the closest astrocytic process in acute hippocampal slices. As previously described, we loaded hippocampal CA1 astrocytes with the Alexa-488 fluorescent dye contained in the intracellular solution of the patch pipette (Fig. 2a left upper panel). In order to identify excitatory synapses, hippocampal slices were immunostained for the pre- and postsynaptic markers VGlut1 and Homer-1, respectively. Several regions of interest per astrocyte were imaged, using both confocal and STED super-resolution microscopy (Fig. 2a right upper panel). The increase in resolution allowed us to discriminate two punctae, which are seen as one in traditional confocal microscopy (Fig. 2a lower panel). To analyse in an automatic and unbiased way the distances of astrocyte processes to synapses, we developed an ImageJ plugin. Using the different images taken in both confocal and STED microscopy, the plugin generates a thresholded image composed of green PAPs and colored center of synapses, based on the proximity of VGlut1 and Homer-1 punctae (Fig. 2b). It then measures the distance between the centre of the two punctae and the closest astroglial process, as shown in the representative images and corresponding line profiles (Fig. 3a and Online methods for detailed analysis). Using this approach, we here analysed the effect of astrocytic IP3R2 deletion or acute calcium chelation (BAPTA or Ca-Clamp) on synapse coverage (Fig. 3a). The cumulative frequencies of astrocyte-synapse distance revealed a significantly different general distribution towards closer distances to synapses for IP3R2^{-/-} (n=15096, p<0.001), BAPTA (n=23761, p<0.001) and

Ca-Clamp (n=30117, $p<0.001$) conditions compared to the Control (n=9632, n refers to the number of synapses, Kolmogorov-Smirnov, Fig. 3b). Interestingly, BAPTA and Ca-Clamp conditions show superimposed distributions, while deficiency for IP3R2 results in a milder effect on the general distribution compared to both BAPTA and Calcium-Clamp conditions ($p<0.001$, Kolmogorov-Smirnov). To gain insight into the specific distance range where the differences in the distributions occur, we looked at the individual frequencies of each astrocyte-synapse distance bin. Remarkably in BAPTA and Ca-Clamp conditions, a shift between increases and decreases in bin frequency occurs at an astrocyte-synapse distance of 200 nm (Fig. 3c). This shift indeed results in a significant increase in the frequencies of short astrocyte-synapse distances (0-180 nm, n=7 bins, $p=0.011$ for Ca-Clamp vs Control and $p=0.021$ for BAPTA vs Control, Friedman test ($p<0.001$) and Dunn's multiple comparisons test, Fig. 3c-d) and a decrease in the far distances compared to the control condition (210 to 510 nm, n=11 bins, $p<0.001$ for Ca-Clamp and BAPTA vs Control, Friedman test and Dunn's multiple comparisons test, Fig. 3c-d). These data indicate that the processes of calcium-chelated astrocytes (BAPTA and Ca-Clamp) are located at closer distances from synapses (0-180 nm) relative to control. In contrast, astroglial processes deficient for IP3R2 were not specifically enriched at short or far distances from synapses compared to the control condition (Fig. 3c-d).

Alteration of calcium signaling in astrocytes is commonly used as a tool to study gliotransmission and its effects on neurotransmission^{15, 16, 21}. Here we reveal that impairing astroglial calcium signaling using several molecular and pharmacological approaches extensively used over the last two decades also alters astrocyte morphology and synapse coverage. Overall, decreasing calcium signaling in astrocytes increases the complexity of their process arborization and their proximity to excitatory synapses. These effects however differ in their extent and cellular localization according to the approach used. Astrocytes from IP3R2^{-/-} mice exhibit increased soma size and domain area, due to the enhanced distal branching of their processes. Compensatory mechanisms may account for these morphological changes in constitutive IP3R2^{-/-} mice. However, astrocytes in this model have already been shown to display a stronger impairment in their calcium signaling at the level of the soma compared to their processes¹⁵. On the other hand, acute calcium chelation leads to a rapid increase in the total length and volume of astroglial processes, resulting from a

strong increase in the number of short proximal processes. We also found that calcium chelation had a stronger effect on synaptic coverage. The increase in small process number and volume could be responsible for the closer proximity of astrocytic processes to synapses.

We previously showed that changes in astrocyte morphology can alter its synaptic coverage, resulting in modulation of synaptic transmission and plasticity¹³. Indeed, an increase in synapse coverage enables perisynaptic astroglial process to compete with postsynaptic compartments and possibly, to alter the diffusion of molecules present in the synaptic cleft. Altogether, these observations suggest that the morphological changes induced by alteration of calcium signaling in astrocytes also contribute *per se* to the regulation of neurotransmission, in addition to the release of neuroactive molecules. Thus, a careful interpretation of past and future experiments manipulating astroglial calcium is needed to differentiate the effects of molecule release from morphological changes and their consequences on neuronal activity.

Online Methods

Animals

Experiments were carried out according to the guidelines of the European Community Council Directives of 1 January 2013 (2010/63/EU), the local animal welfare committee (certificate A751901, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) and our local animal care committees (Center for Interdisciplinary Research in Biology in Collège de France, France). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Animals were group housed on a 12 h light/dark cycle. Experiments were performed on the hippocampus of C57BL6/J and IP3R2^{-/-} mice¹⁴, which were provided by J. Chen, University of California San Diego. Mice of both sexes and littermates were used at postnatal days 19-23.

Acute Hippocampal Slice Preparation and Electrophysiology

Acute transverse hippocampal slices (350 μ m) were prepared as previously described¹³. Slices were maintained at least an hour at room temperature in a storage chamber containing a standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF (in mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1 NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃, and 11 glucose, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂) before the experiments. Slices were transferred to a submerged recording chamber

mounted on an Olympus BX51WI microscope equipped with an infrared-differential interference (IR-DIC) filter and were perfused with ACSF at a rate of 2 ml/min at 32°C. All experiments were performed in CA1 *stratum radiatum*. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from astrocytes using 4-5 MΩ glass pipettes filled with a control intracellular solution composed of (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris (pH 7.4, 280 mOsm). To clamp intracellular free calcium, either 10 mM BAPTA was added to the control intracellular solution or a previously reported “calcium-clamp” solution was used (in mM): KCH₃O₃S 135, HEPES 10, Na₂-Phosphocreatine 10, MgCl₂ 4, Na₂-ATP 4, Na-GTP 0.4, 0.45 EGTA, 0.14 mM CaCl₂ (pH 7.4, 280 mOsm)¹⁷. Astrocytes were identified by their small somata, low input resistance and resting membrane potential, passive membrane properties (linear IV curve) and lack of action potential. The astrocyte was dialysed for 20 min with the intracellular solution of the patch pipette containing the Alexa 488-hydrazide fluorescent dye (0.17 mM, ThermoFischer Scientific, #A10436) using the whole cell configuration of the patch-clamp technique. Recordings were acquired with the MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices), digitized at 10 kHz, filtered at 2 kHz, stored and analyzed on computer using Clampex10.3 and Clampfit10.3 softwares (Molecular Devices).

Immunohistochemistry

Slices were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C. They were then washed 3 times with PBS and preincubated 1 h in blocking solution: PBS-0.2% gelatin in the presence of 1% Triton X-100. Brain slices were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies and washed 3 times. A similar protocol was applied for the secondary antibodies prior rinsing in PBS and mounting in Fluoromount. Primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution as follow: anti-Homer-1 (1/200, Synaptic Systems, #160003), anti-VGlut1 (1/200 Synaptic Systems, #135511), goat anti-Rabbit Alexa594 (1/200, Jackson ImmunoResearch, # 111-586-045) and goat anti-Mouse Alexa647 (1/200, Life Technologies, #A21235).

Confocal and Super-resolution STED Imaging

For the analysis of astrocyte morphology, images of whole astrocytes were taken using a confocal fluorescent microscope (TCS SP5, Leica) with a x63 objective and a x2 zoom. Z-stack

of consecutive confocal images taken at 200 nm intervals were acquired with an argon laser (488 nm) and 3D reconstructions of the astrocytes were performed using the ImaRis software using the filament tool of the software, a reconstruction of astrocytes and their branching was done as illustrated in Fig. 1a. Quantification of several morphological parameters was performed from these astrocytes reconstructions (length of processes, process mean diameter, total length of processes, branch level, soma size, total cell volume) in ImaRis. For analysis of astrocytic ramification, we also performed Sholl analysis on the confocal Z projections images using the concentric circles plugin in the ImageJ software, where 8 circles at 5 μm intervals were drawn around each astrocyte and the number of intersections of astrocytic processes with each circle was quantified. The domain area analysis was also performed directly on the confocal Z projection images of astrocytes using a ROI delineating the whole astrocyte in the ImageJ software.

For the analysis of the astroglial coverage of synapses, images were taken using a super-resolution custom upright STED microscope (Abberior Instruments GmbH). The microscope is based upon a Scientifica microscope body (Slice Scope, Scientifica) with an Olympus 100x/1.4NA ULSAPO objective lens. It comprises a scanner design featuring four mirrors (Quad Scanner, Abberior Instruments). 488 nm, 561 nm, and 640 nm excitation lasers are available (Abberior Instruments, pulsed at 40/80 Mhz). One STED-laser at 775 nm (MPB-C, pulsed at 40/80 MHz) is at disposal. The conventional laser excitation and STED laser beams are superimposed using a beam-splitter (HC BS R785 lambda/10 PV flat, AHF Analysetechnik). Common excitation power with pulsed excitation ranges from 10–20 μW with STED power intensities of up to 200 mW in the focal plane. For each astrocyte, 8 to 10 regions of interest of about 600 μm^2 were imaged. Homer-1 (red) and VGlut1 (far red) were acquired both in confocal and STED resolution. Confocal images were then deconvolved using Huygens software and combined with the STED images in one file for analysis. The analysis is done in ImageJ with an in-house developed plugin to analyze the distance from an identified synapse to the closest astrocyte process. In brief, maxima intensities are identified in the STED images and then compared to the deconvolved confocal images to remove false positive punctae. When two punctae from Homer-1 and VGlut1 are within 300 μm from each other, a synapse is assigned as a pixel in between the two punctae. The distance from the synapse/pixel to the closest astrocyte process is determined with a thresholded image of the deconvolved astrocyte.

Statistics

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance for within-group comparisons was determined by analysis of variances (one-way or two-way ANOVAs), Kruskal Wallis or Friedman test followed by multiple comparisons test. The analysis of distribution was performed using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical significance was established at ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$ and *: $p < 0.05$. All the statistical analysis was performed with GraphPad Prism software.

References

1. Santello, M., Toni, N. & Volterra, A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci* 22, 154-166 (2019).
2. Stogsdill, J.A., et al. Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature* 551, 192-197 (2017).
3. Dallerac, G., Zapata, J. & Rouach, N. Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: where, when and how? *Nat Rev Neurosci* 19, 729-743 (2018).
4. Bernardinelli, Y., et al. Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Curr Biol* 24, 1679-1688 (2014).
5. Haber, M. & Murai, K.K. Reshaping neuron-glia communication at hippocampal synapses. *Neuron Glia Biol* 2, 59-66 (2006).
6. Volterra, A., Liaudet, N. & Savtchouk, I. Astrocyte Ca^{2+} signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci* 15, 327-335 (2014).
7. Savtchouk, I. & Volterra, A. Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci* 38, 14-25 (2018).
8. Fiacco, T.A. & McCarthy, K.D. Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. *J Neurosci* 38, 3-13 (2018).
9. Khakh, B.S. & McCarthy, K.D. Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020404 (2015).
10. Izadi, M., Hou, W., Qualmann, B. & Kessels, M.M. Direct effects of Ca^{2+} /calmodulin on actin filament formation. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 355-360 (2018).

11. Qian, D. & Xiang, Y. Actin Cytoskeleton as Actor in Upstream and Downstream of Calcium Signaling in Plant Cells. *Int J Mol Sci* 20 (2019).
12. Oliet, S.H., Piet, R. & Poulain, D.A. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292, 923-926 (2001).
13. Pannasch, U., et al. Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat Neurosci* 17, 549-558 (2014).
14. Li, X., Zima, A.V., Sheikh, F., Blatter, L.A. & Chen, J. Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP₃)-receptor type 2-deficient mice. *Circ Res* 96, 1274-1281 (2005).
15. Srinivasan, R., et al. Ca²⁺ signaling in astrocytes from Ip3r2(-/-) mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nat Neurosci* 18, 708-717 (2015).
16. Xie, A.X., Petravicz, J. & McCarthy, K.D. Molecular approaches for manipulating astrocytic signaling in vivo. *Front Cell Neurosci* 9, 144 (2015).
17. Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H. & Rusakov, D.A. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232-236 (2010).
18. Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.C. & Robitaille, R. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci* 26, 5370-5382 (2006).
19. Ventura, R. & Harris, K.M. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19, 6897-6906 (1999).
20. Witcher, M.R., et al. Three-dimensional relationships between perisynaptic astroglia and human hippocampal synapses. *Glia* 58, 572-587 (2010).
21. Araque, A., et al. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728-739 (2014).

Acknowledgments

We thank C. Joséphine for technical assistance, and all members of the Rouach laboratory for discussions. This work was supported by grants from the European Research Council (Consolidator grant #683154) and European Union's Horizon 2020 research and innovation program (Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Networks, grant #722053, EU-GliaPhD) to N. R. and ED3C doctoral school to A.C..

Author contributions

Conceptualization: Nathalie Rouach; Data curation: Anna Capano, David Mazaud, Nathalie Rouach; Formal analysis: Anna Capano, David Mazaud, Philippe Mailly; Funding acquisition: Nathalie Rouach; Anna Capano; Investigation: Anna Capano, David Mazaud, Jonathan Zapata; Supervision: Nathalie Rouach; Project administration: Nathalie Rouach; Validation: David Mazaud, Anna Capano, Nathalie Rouach; Writing – original draft: David Mazaud, Anna Capano; Nathalie Rouach; Writing – review & editing: all authors.

Competing interests

The authors declare that they do not have competing interests.

Figure legends

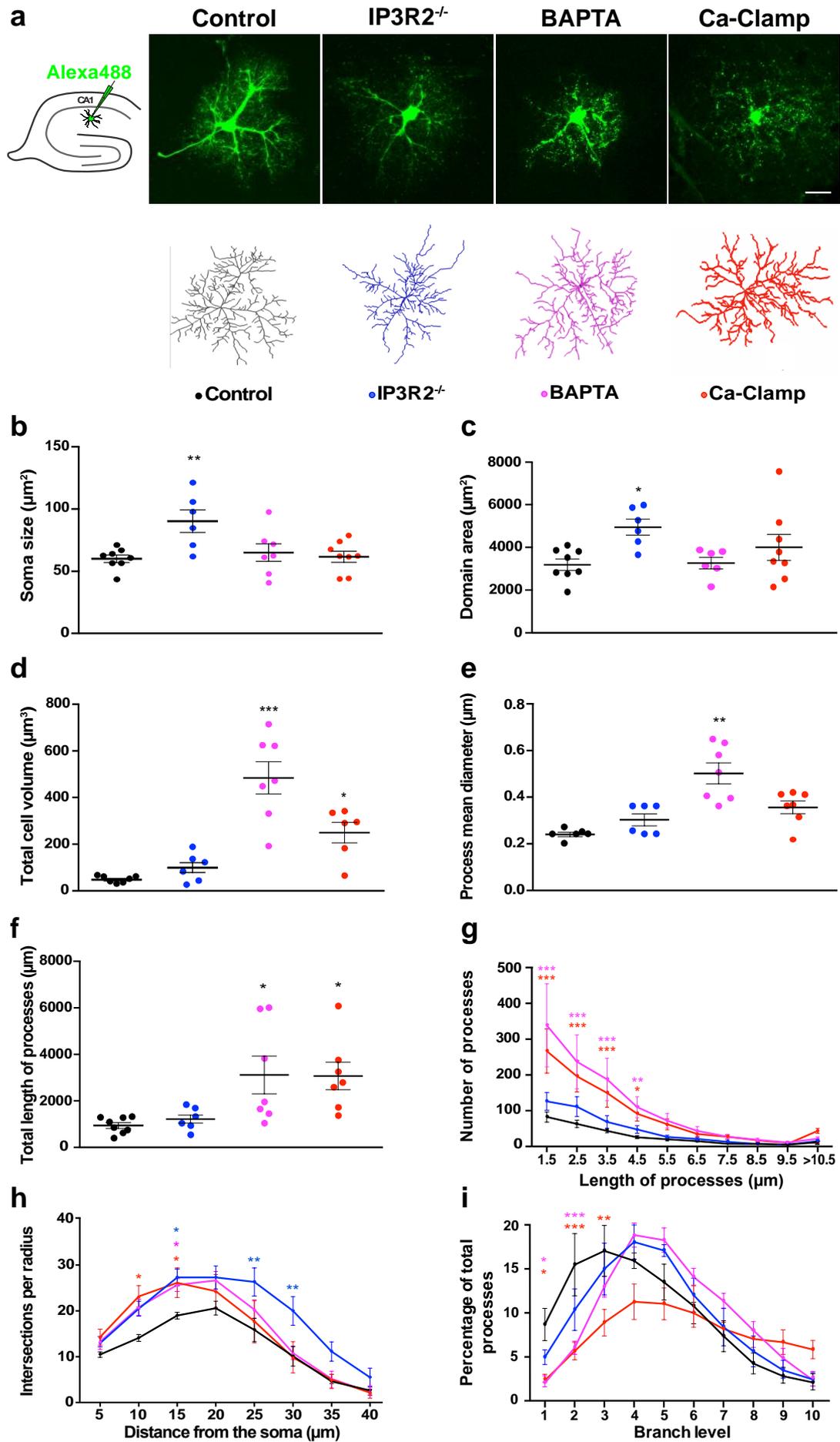
Figure 1. Intracellular calcium signaling modulates astroglial morphology. **a.** Representative images of hippocampal astrocytes from wild type or IP3R2^{-/-} mice dialysed by patch-clamp with Alexa-488 (green) contained either in a control intracellular solution (Control or IP3R2^{-/-} respectively) or in intracellular solutions clamping calcium (BAPTA or Ca-Clamp) in wild type astrocytes (upper panels). The corresponding Imaris reconstructions are shown under each representative image (lower panels: Control (black); IP3R2^{-/-} (blue); BAPTA (magenta); Ca-Clamp (red)). **b.** Soma size of the astrocytes dialyzed in the different conditions with Alexa-488, measured on the Z projection images as shown in the upper panel (One-way ANOVA (p=0.0063) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test compared to Control (n=8): IP3R2^{-/-}, n=6, p=0.008; BAPTA, n=7, p=0.9327; Ca-Clamp, n=8, p=0.9976). **c.** Astrocytes domain area (One-way ANOVA (p=0.0349) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test compared to Control (n=8): IP3R2^{-/-}, n=6, p=0.0395; BAPTA, n=6, p=0.9997; Ca-Clamp, n=8, p=0.4911). **d.** Total cell volume measured by the sum of all processes volumes (One-way ANOVA (p<0.0001) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test compared to Control (n=7), IP3R2^{-/-}, n=6, p=0.8528; BAPTA, n=7, p<0.0001; Ca-Clamp, n=6, p=0.0194). **e.** Astroglial

processes mean diameter, measured via ImaRis reconstruction as shown in the lower panel (Kruskall Wallis ($p=0.002$) with Dunn's multiple comparisons post-hoc test compared to Control ($n=6$), IP3R2^{-/-}, $n=6$, $p>0.99$; BAPTA, $n=7$, $p=0.0017$; Ca-Clamp, $n=7$, $p=0.1132$). **f.** Total length of astroglial processes measured by the sum of all individual processes length (One-way ANOVA ($p=0.006$) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test compared to Control ($n=8$), IP3R2^{-/-}, $n=6$, $p=0.987$; BAPTA, $n=7$, $p=0.0246$; Ca-Clamp, $n=7$, $p=0.0284$). **g.** Distribution of individual processes length (Two-way ANOVA ($p<0.0001$) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test compared to Control (Control, $n=8$; IP3R2^{-/-}, $n=6$; BAPTA, $n=7$; Ca-Clamp, $n=7$; 1.5 μm : BAPTA, $p<0.0001$; Calcium-Clamp, $p<0.0001$; 2.5 μm : BAPTA, $p<0.0001$; Calcium-Clamp: $p<0.0001$; 3.5 μm : BAPTA, $p<0.0001$; Calcium-Clamp, $p<0.0001$; 4.5 μm : BAPTA, $p=0.0021$; Calcium-Clamp, $p=0.0272$). **h.** Sholl analysis to quantify astroglial branching (Two-way ANOVA with repeated measures ($p=0.0287$) with Neuman-Keuls post-hoc test compared to Control (Control, $n=8$; IP3R2^{-/-}, $n=6$; BAPTA, $n=7$; Ca-Clamp, $n=8$). **i.** Distribution of individual processes branch level, as a percentage of total number of processes (Two-way ANOVA ($*p=0.0061$) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test compared to Control (Control, $n=8$; IP3R2^{-/-}, $n=6$; BAPTA, $n=7$; Ca-Clamp, $n=7$). Asterisks indicate statistical significance compared to the Control condition ($***p<0.001$; $**$: $p<0.01$ and $*$: $p<0.05$).

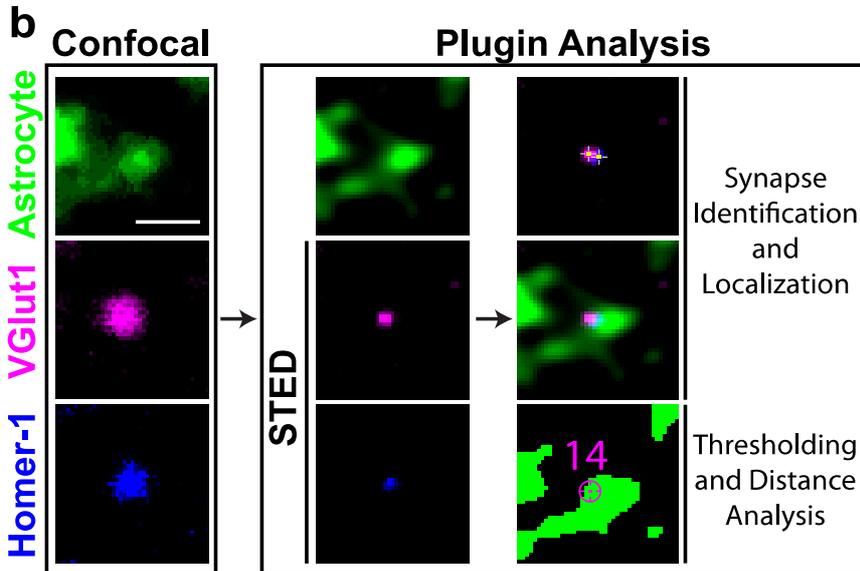
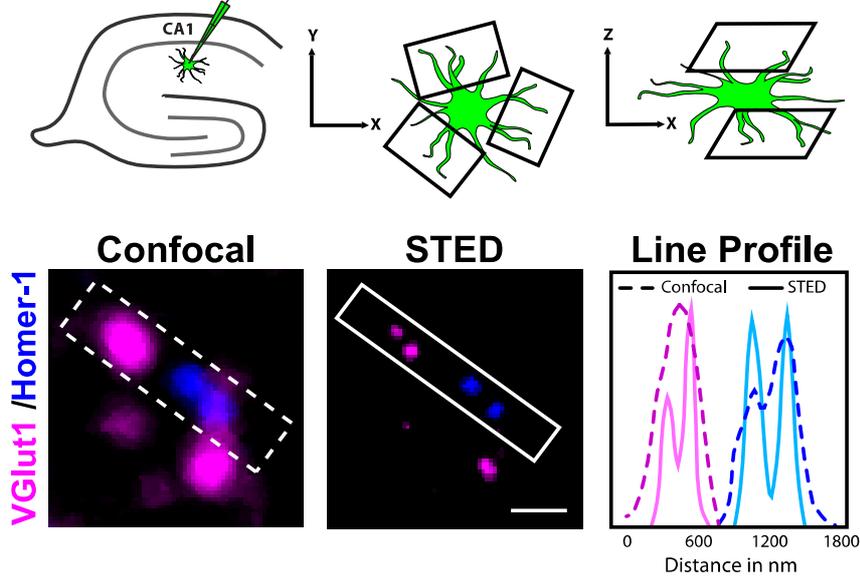
Figure 2. Method for astrocyte to synapse distance measurement and analysis. A. Schematic representation of a hippocampal slice where a CA1 astrocyte was dialysed with an intracellular solution containing the Alexa-488 hydrazide dye (0.17 mM) for 20 min (upper panel). Slices were then fixed and immunostained for the excitatory presynaptic marker VGlut1 (in magenta) and the postsynaptic marker Homer-1 (in blue) (lower panel). Six to nine regions of interest (ROI) were acquired on different Z planes per astrocyte, toward the edges of the processes as shown on the upper right panel. Each image is taken both in confocal and STED super-resolution modes of the custom-designed microscope, as shown on the representative images (lower left panel). Scale bar: 500 nm. The improvement of resolution is also shown by Line Profile analysis, (lower right panel), corresponding to the white-squared area on the left panel pictures. **B.** The 3-color confocal images were deconvolved using Huygens software (left panel) and combined within one file with the corresponding STED images (right panel). Scale bar: 500 nm. In-house developed ImageJ

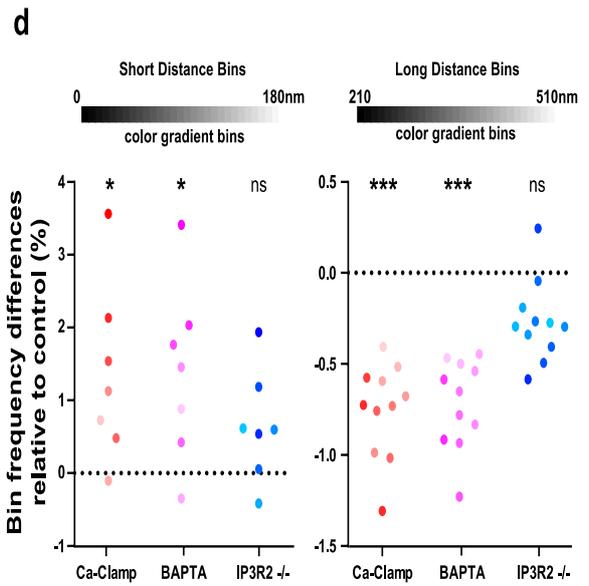
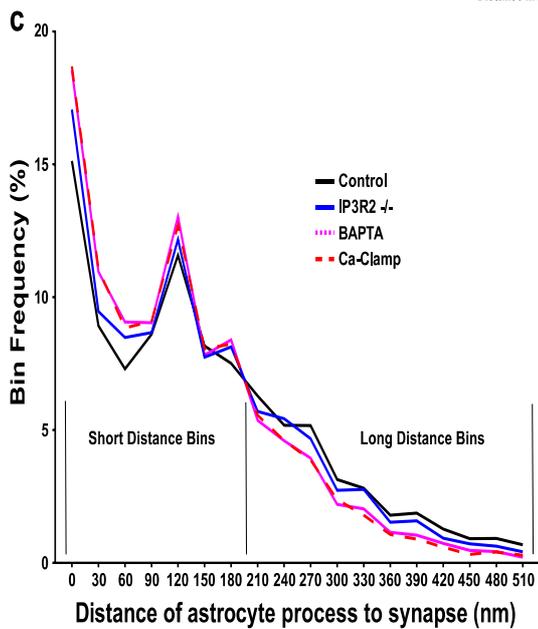
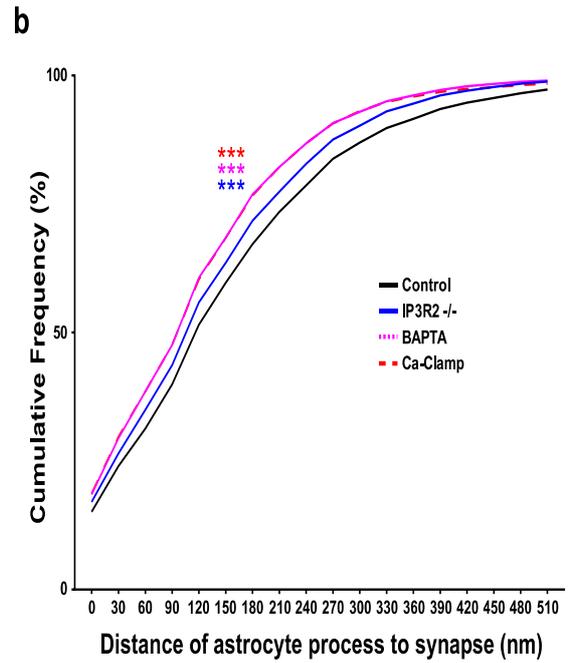
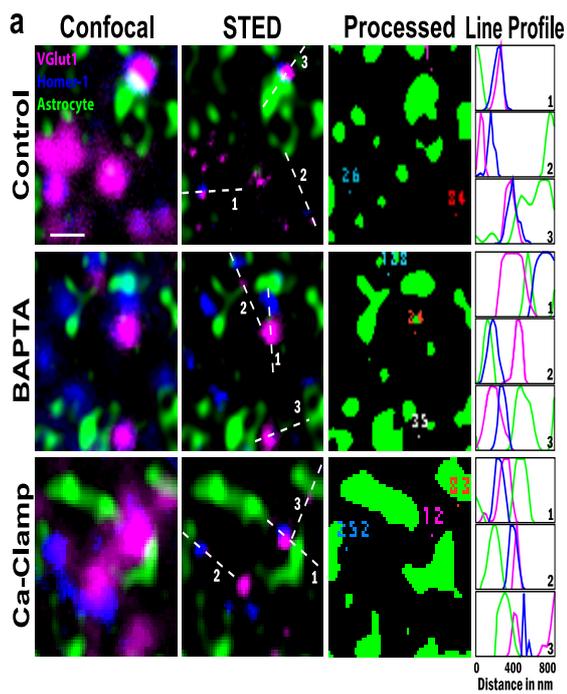
plugin identifies synapses based on VGlut1 and Homer-1 proximity (see online methods). A threshold is applied onto the deconvolved image of the astrocyte. The distance between the identified synapse and the closest astrocyte process is measured using the 30 nm-pixel size of the image as scale. When the synapse is localized within the threshold area of the astrocyte, the distance is counted as zero. The annotated number above the synapse is arbitrary given by the plugin for its identification during the analysis.

Figure 3. Intracellular astroglial calcium level regulates astrocytic processes proximity to synapses. **A.** Representative images astrocyte processes (green), presynaptic (magenta) and postsynaptic (blue) compartments in Control, BAPTA and Ca-Clamp conditions. Three synapse-to-astrocyte distances per image are shown as examples with their line profile analysis (drawn with dashed lines on the STED pictures and shown on the right panel with corresponding numbers). Synapses and astrocyte processes are identified by the ImageJ plugin as shown in the “Processed” panel with 3 synapses identified and localized in each condition (colored numbers). Scale bar: 500 nm. **b.** Cumulative frequencies of astrocyte PAPs to synapse distances, showing a significantly different distribution of IP3R2^{-/-} (n=15096), BAPTA (n=23761) and Ca-Clamp (n=30117) conditions compared to the Control (n=9632, n refers to the number of synapses, Kolmogorov-Smirnov, p<0.001). **c.** The four distributions of astrocyte process to synapse distances analysed in **b** are here presented in percent frequency. **d.** The distributions in percent frequency presented in **c** is here analysed in frequency differences grouped in short (n=7 first bins from 0 to 180 nm) and long distances (n=11 bins from 210 to 510 nm). The IP3R2^{-/-}, BAPTA and Ca-Clamp conditions are compared to Control. Ca-Clamp and BAPTA conditions show a significant increase in percent frequencies of short distances and a significant decrease in long distances (Friedman test and Dunn’s multiple comparisons test, p<0.001 and p=0.011 for Ca-Clamp vs Control and p=0.021 for BAPTA vs Control for the short distance analysis).



a **Alexa488** **Multiple ROI images/Astrocyte**





PARTIE II : LES ASTROCYTES MODULENT LA PLASTICITÉ ET LE COMPORTEMENT INDUITS PAR LA COCAÏNE

Dans cette étude, nous avons étudié le rôle des astrocytes, via notamment la Cx30, dans les mécanismes de la sensibilisation à la cocaïne. Pour ce faire, nous avons investigué plusieurs axes. Tout d'abord, nous nous sommes intéressées au comportement locomoteur induit par la cocaïne, et avons notamment recherché si les astrocytes, via la Cx30, influent sur la sensibilisation locomotrice à la cocaïne. Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents, nous avons ensuite cherché à connaître les effets de la cocaïne sur les propriétés caractéristiques des astrocytes dans le NAc, en particulier sur leur expression de marqueurs types et morphologie cellulaire. Enfin, nous avons étudié au niveau des neurones l'effet de la Cx30 sur la plasticité des transmissions dopaminergiques et glutamatergiques induites par la cocaïne dans le NAc.

1. LA CONNEXINE 30 MODULE L'EFFET LOCOMOTEUR DE LA COCAÏNE

Rationnel : La cocaïne induit plusieurs effets au niveau comportemental dont le principal consiste en une augmentation de l'activité locomotrice (Bedford, Karen Lovell, Turner, Elsohly, & Wilson, 1980). Il a été montré que des changements de transmission glutamatergique dans le NAc contribuent aux modulations comportementales induites par la cocaïne (Kalivas, 2009). De façon intéressante, notre laboratoire a récemment montré que la transmission glutamatergique dans l'hippocampe est régulée par les astrocytes, via des changements de morphologie et couverture des synapses dépendant de la Cx30 (Pannasch et al., 2014)., Ainsi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les astrocytes, via la Cx30, pourraient moduler l'induction d'une activité locomotrice par la cocaïne. Pour ce faire, nous avons mesuré la distance parcourue par les animaux sauvages ou déficients en Cx30 à la suite d'injections de cocaïne, en utilisant le protocole de sensibilisation à la cocaïne.

1.1. L'activité locomotrice induite par la cocaïne est réduite en l'absence de Cx30 astrogliale

Tout d'abord, nous avons réalisé un protocole de sensibilisation à la cocaïne sur des souris sauvages (+/+) et Cx30^{-/-}, avec un groupe contrôle injecté avec de la solution saline. Nous avons observé que le groupe des souris sauvages traitées par la cocaïne présente une activité locomotrice bien supérieure au groupe des souris sauvages injectées avec une solution saline (Figure 14B, +/+ saline vs +/+ cocaïne *** $p < 0.0001$, ANOVA deux voies à mesures répétées, $n=6$), et une sensibilisation à la cocaïne (Day1 +/+ cocaïne=247.9±19.30 vs Day5 +/+ cocaïne=378.6±26.20, *** $p < 0.0001$ avec un test ANOVA une voie avec un test de comparaisons multiples de Dunnett, $n=6$). Il est intéressant de noter que cette sensibilisation est pérenne, comme l'atteste la distance parcourue par les souris après l'injection « challenge », c'est-à-dire 10 jours après la dernière injection (Day1 +/+

cocaïne=247.9±19.30 vs Challenge +/+ cocaïne=383.8±22.27, test ANOVA une voie avec un test de comparaisons multiples de Dunnett, n= 6).

De manière similaire, le groupe Cx30^{-/-} cocaïne présente une activité locomotrice supérieure à celle de son groupe contrôle (-/- saline vs -/- cocaïne ***p<0.0001, ANOVA deux voies à mesures répétées, n=6). Les souris déficientes en Cx30 sensibilisent aussi à la cocaïne sur le long-terme (Day1 -/- cocaïne=96.36±23,81 vs Day5 -/- cocaïne=201.1±27.07, *p<0.05 et vs Challenge=263.9±29.92, ***p<0.001, avec ANOVA une voie et test post-hoc de Dunnett, n=6).

Cependant, en comparant l'effet locomoteur de la cocaïne sur les deux génotypes, nous observons que l'absence de Cx30 réduit significativement l'effet locomoteur induit par la cocaïne (+/+ cocaïne vs -/- cocaïne, ***p<0.0001 avec test ANOVA deux voies à mesures répétées, n=6).

De ces résultats, nous concluons que l'absence de Cx30 astrocytaire réduit significativement les effets locomoteurs de la cocaïne à la suite de chaque injection, sans inhiber la mise en place d'une sensibilisation locomotrice à la cocaïne sur le long-terme.

1.2. L'effet de la Cx30 astrocytaire sur l'activité locomotrice induite par la cocaïne est sous-tendu par les fonctions non-canal de la Cx30

Rationnel: La Cx30 a des fonctions canaux (communication jonctionnelle et hélicanaux) et non-canal (adhésion cellulaire, interactions protéiques, signalisation intracellulaire). Les travaux du laboratoire ont montré que c'est la fonction non-canal de la Cx30 qui est impliquée dans la régulation de la transmission synaptique excitatrice dans l'hippocampe. Nous avons donc recherché ici si c'est la même fonction non canal qui est impliquée dans la régulation astrogliale de l'activité locomotrice induite par la cocaïne. Pour ce faire, nous avons, utilisé les souris Cx30 T5M/T5M. Dans ces souris, le remplacement de la thréonine par une méthionine ne position 5 de la Cx30 induit un canal défectueux, mais la protéine est toujours présente à la membrane (Schütz et al., 2010).

Résultats : Nous avons observé que ces souris présentaient une activité locomotrice forte induite par la cocaïne (Figure 14D, Cx30T5M saline vs Cx30T5M cocaïne, ***p =0.0004, ANOVA deux voies à mesures répétées, n=6), ainsi qu'une sensibilisation pérenne à la cocaïne (Day1 Cx30T5M cocaïne=212.9±37.80 vs Day5 Cx30T5M cocaïne=428.9±52.35, *p<0.05, Day1 Cx30T5M vs Challenge Cx30T5M=493.7±38.81, ***p<0.0001, ANOVA une voie avec test post-hoc de Dunnett, n=8), similaires à celles observées chez les souris sauvages (+/+ cocaïne vs Cx30T5M cocaïne, p=0.23, ANOVA deux voies à mesures répétées, n=6 et n=8 respectivement) et significativement différentes des souris Cx30^{-/-} (-/- cocaïne vs Cx30T5M cocaïne, ***p=0.0005, ANOVA deux voies à mesures répétées, n=6 et n=8 respectivement). Ces données indiquent que les fonctions canal de la Cx30 ne sont pas impliquées dans l'augmentation d'activité locomotrice induite par la cocaïne.

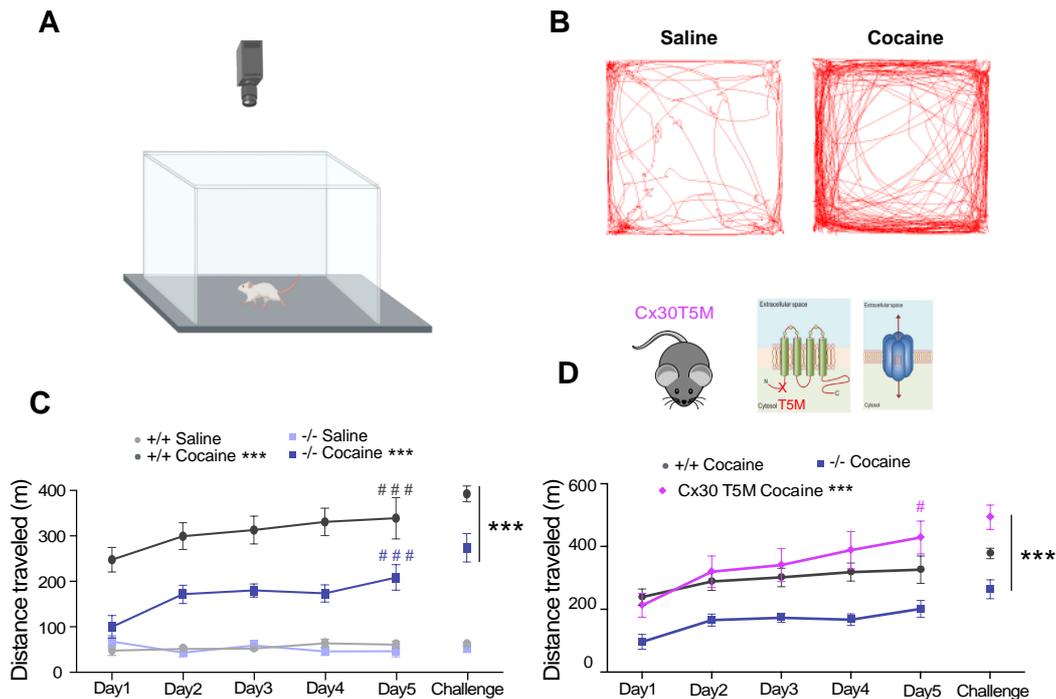


Figure 14 : La Cx30 régule les effets locomoteurs de la cocaïne via sa fonction non canal.

A. Illustration du système de champ ouvert (open field) utilisé pour mesurer l'activité locomotrice. B. Illustration de l'activité locomotrice dans un champ ouvert des souris +/+ après injections de solution saline ou de cocaïne, suivi par une caméra en live. C. Mesures de la distance parcourue par les animaux sauvages (+ /+, n=6) ou Cx30-/- (-/-, n=6) dans les 30 minutes suivant l'injection de cocaïne ou de solution saline, sur 5 jours consécutifs et lors d'une injection challenge 10 jours après la dernière injection. Les étoiles à côté des légendes représentent la significativité de la différence de ces groupes avec leur contrôle (ANOVA deux voies), les étoiles sur le côté sont relatives à la différence significative entre les courbes +/+ cocaïne et -/- cocaïne (ANOVA deux voies), les dièses, aux couleurs de la courbe à laquelle ils se réfèrent, représentent la différence entre la mesure au jour 5 et celle au jour 1, indicatifs d'une sensibilisation à la cocaïne (ANOVA une voie). D. Schéma d'une souris Cx30T5M, possédant une mutation unique en position 5 (thréonine en méthionine) affectant la partie N-terminale de la Cx30, résultant en une inhibition de sa fonction canal. *Modifié à partir de Gajardo-Gómez, Labra, & Orellana, 2016 (haut)*. Mesure des distances parcourues par les animaux Cx30+/+, Cx30-/- ou Cx30 T5M après injection de cocaïne, lors de la sensibilisation à celle-ci (bas). Les étoiles sur le côté représentent la différence entre les groupes Cx30T5M et Cx30-/-, les autres suivent la même logique que celles en C.

De ces résultats, nous concluons que la Cx30 régule les effets locomoteurs de la cocaïne via ses fonctions canal-indépendantes.

Nous avons ensuite étudié les mécanismes sous-jacents aussi bien aux niveaux astrocytaires que neuronaux afin d'élucider les bases cellulaires de cette régulation gliale de l'effet locomoteur de la cocaïne.

2. MODIFICATIONS ASTROCYTAIRES DANS LE NAC INDUITES PAR LA COCAÏNE

2.1. Augmentation de l'expression de la Cx30 dans le NAc induite par la cocaïne

Rationnel : La déficience en Cx30 réduit les effets locomoteurs de la cocaïne, ce qui suggère un lien entre le niveau d'expression de la Cx30 et les effets comportementaux de la cocaïne. Nous avons donc recherché si la cocaïne induit un changement d'expression de la Cx30 dans le NAc.

Résultats : Suite à un protocole de sensibilisation à la cocaïne chez la souris, nous avons observé une augmentation des niveaux de Cx30 dans les astrocytes du NAc comparé à ceux des souris traitées avec une solution saline. Cette augmentation d'expression a été observé par western blot (Figure 15C-D, saline=1.13±0.14 vs cocaïne=1.96±0.30, test de Mann-Whitney *p=0.0411, n=6), ainsi que par immunomarquage (Figure 15 A-B, saline=2.26±0.21 vs cocaïne=3.87±0.35, t-test non apparié, ***p=0.0005, n=3).

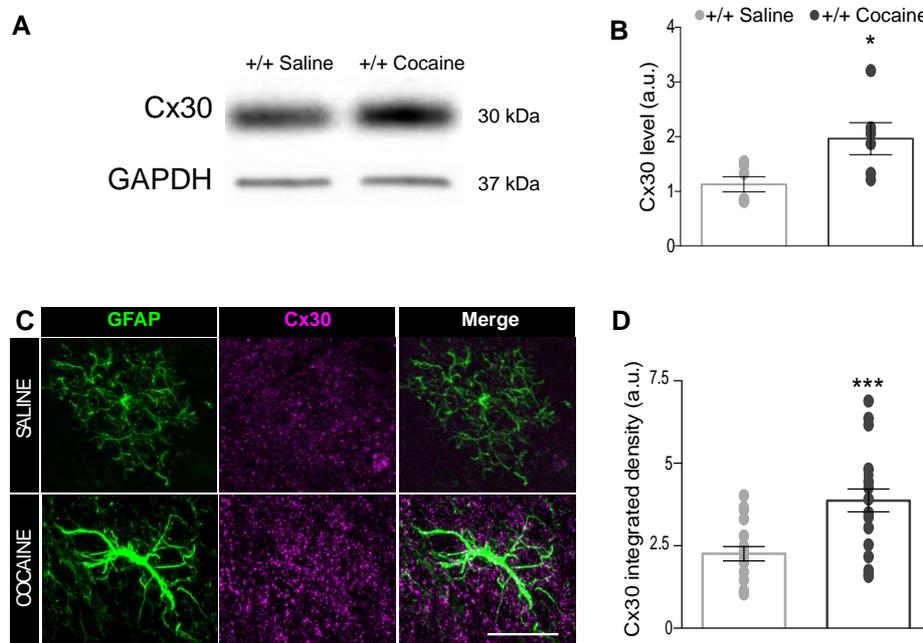


Figure 15 : Augmentation des niveaux de Cx30 dans le NAc après administration de cocaïne. A. Western Blot représentatif de la Cx30 (30 kDa) dans le NAc de souris sauvages après injections de solution saline ou de cocaïne (n=6). Western blot pour la protéine GAPDH (37 kDa), qui sert de contrôle de charge. B. Quantification de l'intensité des bandes de Cx30 dans le NAc par western blot. Ratio Cx30/GAPDH (test de Mann-Whitney *p=0.0411, n=6). C. Immunomarquage de Cx30 des astrocytes (cellules GFAP-positives) dans le NAc après injections de cocaïne ou de solution saline. Echelle, 20µm. D. Quantification de l'immunomarquage de la Cx30 dans des régions d'intérêt positives à la GFAP (t-test non apparié, ***p<0.0001).

En conclusion, la cocaïne augmente l'expression de la Cx30 dans les astrocytes du NAc.

2.2. Éléments du mécanisme de régulation de l'expression de la Cx30 par la cocaïne

Rationnel : L'expression de la Cx30 est activité-dépendante et dépend notamment de la transmission glutamatergique dans l'hippocampe (Ghézali et al., 2019). Elle est aussi fortement régulée dans diverses situations physiologiques et pathologiques, telles que l'environnement enrichi (Rampon et al., 2000), la psychostimulation (Liu et al., 2013) ou l'épilepsie (Condoirelli et al., 2002) qui augmentent l'expression de la Cx30, ou encore gliomes (Princen, 2001), la dépression (Bernard et al., 2011) ou le suicide chez l'homme (Ernst et al., 2011) qui diminuent son expression. La cocaïne est connue pour augmenter la transmission excitatrice dans le NAc (Cooper et al., 2017). Nous avons donc ici cherché à caractériser la régulation de l'expression de la Cx30 par la cocaïne en investiguant s'il s'agit d'un effet transcriptionnel et/ou activité-dépendant. Pour ce faire, nous avons d'abord mesuré les niveaux d'ARN messagers de Cx30 chez les souris traitées à la cocaïne. Nous avons également mesuré les niveaux protéiques de Cx30 dans les souris IP3R2^{-/-}. Ces souris ont en effet des défauts de signalisation calcique dans les astrocytes, or nous savons que la signalisation calcique astrocytaire est notamment induite par l'activité neuronale glutamatergique (Parpura et al., 1994).

Résultats : Nous avons montré que les niveaux d'ARNm de Cx30 dans le NAc sont inchangés chez les souris traitées à la cocaïne comparé aux souris traitées à la solution saline (Figure 16, saline=0.92±0.14 et cocaïne=1.00±0.20, test de Mann-Whitney, p=0.7, n=3).

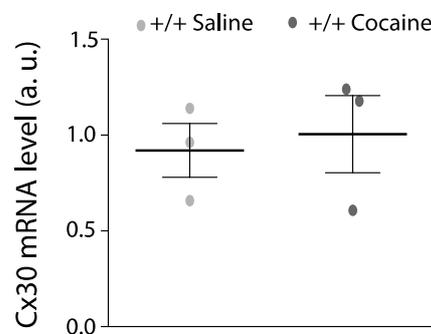


Figure 16 : Les niveaux d'ARNm de la Cx30 sont inchangés par la cocaïne. Quantification des niveaux d'ARNm de Cx30 du NAc à partir de produits de qPCR (pas de changement significatif, test de Mann-Whitney, p=0.7, n=3).

Ces données indiquent que l'augmentation des niveaux de Cx30 dans le NAc induite par la cocaïne n'est pas d'origine transcriptionnelle.

Nous avons ensuite investigué si les niveaux de Cx30 dans le NAc de souris invalidées pour les récepteurs 2 de l'IP₃ (IP₃R2^{-/-}) étaient modifiés par la cocaïne. Ici encore, nous n'observons pas de différence significative entre les deux groupes (Figure 17A-B, saline=0.97±0.07 vs cocaïne=1.27±0.30, t-test non apparié p=0.36, n=35 et 13 ROI respectivement, 3 animaux chacun).

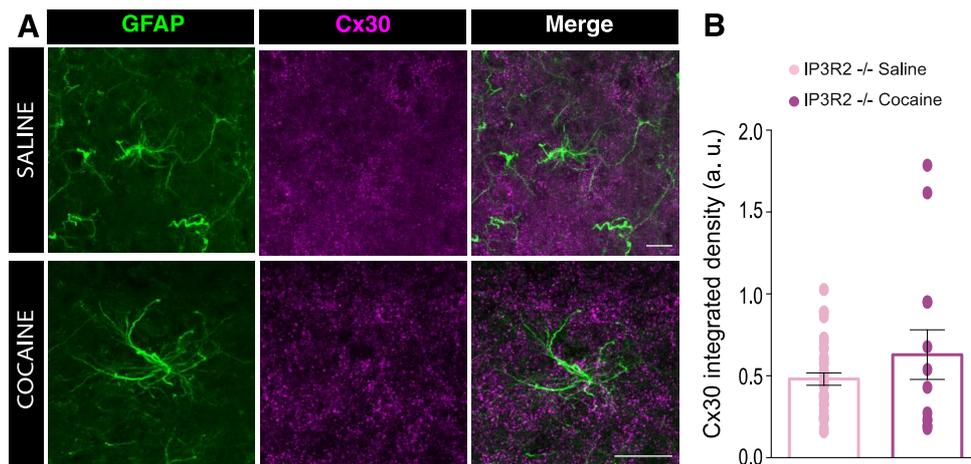


Figure 17 : La cocaïne ne change pas l'expression de la Cx30 dans le NAc de souris IP3R2-/-. A. Immunomarquage d'astrocytes (GFAP) et de Cx30 dans le NAc, après injections de cocaïne ou de solution saline. Echelle, 20 μ m. Quantification de la fluorescence de Cx30 (pas de différence significative entre les deux groupes, $p=0.36$, t-test non apparié, $n(\text{IP3R2-/- Saline})=35$ ROI/3 animaux, $n(\text{IP3R2-/-})=13$ ROI/3 animaux).

Ces données montrent que l'augmentation de Cx30 induite par la cocaïne est dépendante de la signalisation calcique astrocytaire.

2.3. Spécificité de l'augmentation de l'expression de la Cx30 par la cocaïne dans le NAc

Rationnel : Nous avons ici investigué si l'effet de la cocaïne sur l'expression de la Cx30 est spécifique au NAc ou non. Pour ce faire, nous avons évalué les niveaux de Cx30 après traitement par cocaïne dans deux autres régions du cerveau, le cortex médian et le cortex préfrontal.

Résultats : Nous n'observons pas d'augmentation des niveaux de Cx30 dans le cortex médian après traitement à la cocaïne, ni en immunomarquage (Figure 18A-B, +/+ saline= 0.43 ± 0.01 vs +/+ cocaïne= 0.41 ± 0.01 , $p=0.781$, t-test non apparié, $n=3$), ni en immunoblot (Figure 18C-D, +/+ saline= 0.67 ± 0.14 vs +/+ cocaïne= 0.58 ± 0.14 , $p=0.40$, test de Mann-Whitney, $n=23$ ROI (3 animaux)).

Par contre cette augmentation d'expression est retrouvée dans le cortex préfrontal en immunomarquage (Figure 18E-F, +/+ saline= 2.12 ± 0.21 vs +/+ cocaïne= 4.49 ± 0.90 , $**p=0.004$, test de Mann-Whitney, $n=14$ ROI (3 animaux)).

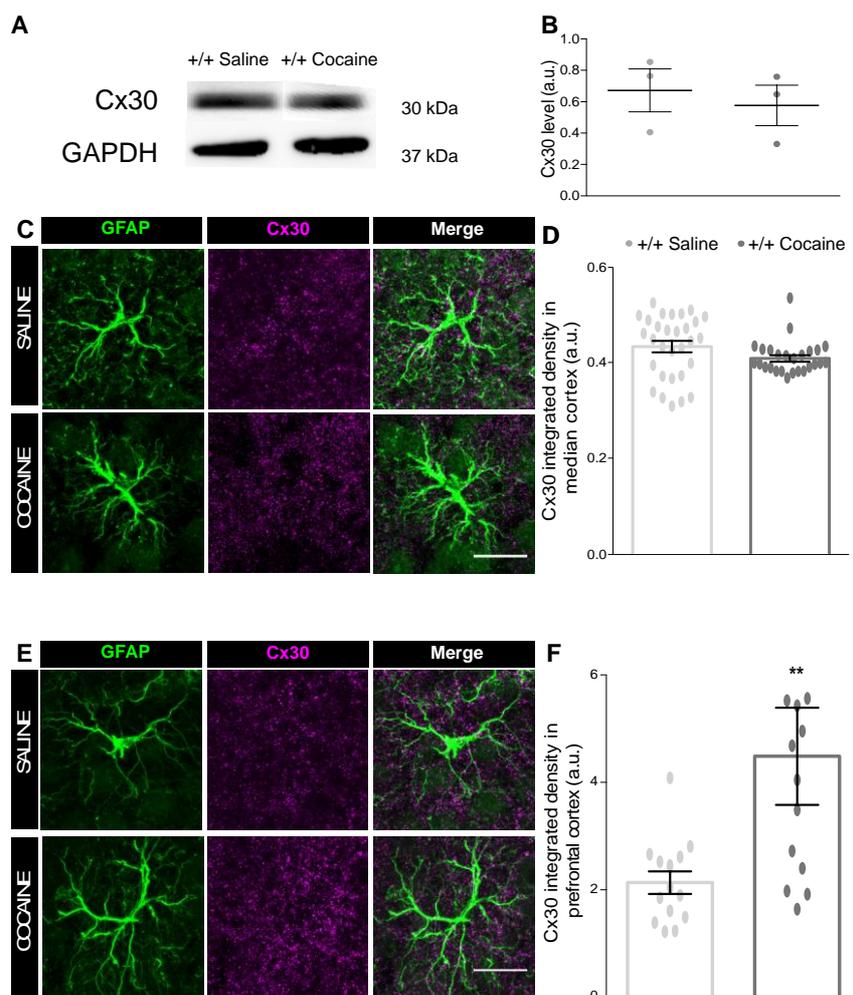


Figure 18 : La cocaïne induit un changement d'expression de la Cx30 dans le NAc et le cortex préfrontal, mais pas dans le cortex médian. A. Western blot représentatif de la Cx30 dans le cortex médian de souris sauvages après injections de solution saline ou de cocaïne. Western blot pour la protéine GAPDH (37 kDa), qui sert de contrôle de charge. B. Quantification de la Cx30 dans le cortex par western blot; ratio Cx30/GAPDH ($p=0.40$, test de Mann-Whitney, $n=23$ ROI (3 animaux)). C. Immunomarquage de Cx30 des astrocytes (cellules GFAP-positives) dans le cortex médian après injections de cocaïne ou de solution saline. Echelle: 20 μm . D. Quantification de la fluorescence de la Cx30 dans des régions d'intérêt positives à la GFAP (t-test non apparié, $p=0.078$, $n(+/+ \text{ saline})=30$ ROI/3 animaux, $n(+/+ \text{ cocaïne})=26$ ROI/3 animaux). E. Immunomarquage de Cx30 des astrocytes (cellules GFAP-positives) dans le cortex préfrontal après injections de cocaïne ou de solution saline. Echelle: 20 μm . F. Quantification de la fluorescence de la Cx30 dans des régions d'intérêt positives à la GFAP (test de Mann-Whitney, $**p=0.004$, $n(+/+ \text{ saline})=14$ ROI/3 animaux, $n(+/+ \text{ cocaïne})=13$ ROI/3 animaux).

Ainsi, ces résultats indiquent que l'augmentation des niveaux de Cx30 induite par la cocaïne n'a pas lieu dans toutes les régions du cerveau, mais est observée dans plusieurs régions du circuit de l'addiction, telle que le NAc et le cortex préfrontal.

2.4. L'activité locomotrice induite par la cocaïne n'est pas dépendante des niveaux de Cx30 dans le NAc

Rationnel : Tout d'abord, nous avons noté une diminution de l'activité locomotrice induite par la cocaïne en l'absence de Cx30. Après avoir observé que la cocaïne induit une augmentation des niveaux de Cx30 dans le NAc, nous nous sommes donc interrogées sur l'influence des niveaux d'expression de Cx30 dans le NAc sur l'activité locomotrice induite par la cocaïne. En utilisant des injections intracérébrales de vecteurs viraux (Figure 19A), nous avons pu induire l'expression de la Cx30 spécifiquement dans les NAc de souris contrôles et déficientes en Cx30 (Figure 19B). Ainsi, en mesurant l'activité locomotrice induite par la cocaïne sur ces modèles d'expression de Cx30 spécifiques au NAc, nous pouvons déterminer si la Cx30 du NAc est un facteur nécessaire à l'induction par la cocaïne d'une forte activité locomotrice.

Résultats : Induire une surexpression de Cx30 spécifiquement dans le NAc de animaux contrôles ne change pas l'activité locomotrice sous-tendue par la cocaïne observée dans ceux exprimant un niveau basal de Cx30 (Figure 19C, Control AAV-GFP-Cx30 vs Control AAV-GFP, $p=0.38$, test ANOVA deux voies, $n=6$). De plus, induire une expression de Cx30 dans le NAc des animaux déficients en Cx30 n'augmente pas l'activité locomotrice induite par la cocaïne (Figure 19D, Cx30^{-/-} AAV-GFP-Cx30 vs Cx30^{-/-} AAV-GFP, $p=0.79$, test ANOVA deux voies, $n=3$ et 6 respectivement). De plus, nous observons une sensibilisation à la cocaïne dans tous ces groupes (Figure 19C, Control AAV-GFP $D_1=209.5\pm 25.14$ vs Control AAV-GFP $D_5=294.5\pm 26.37$, $*p=0.024$, test ANOVA une voie, $n=6$; Control AAV-GFP-Cx30 $D_1=139.6\pm 21.00$ vs Control AAV-GFP-Cx30 $D_5=275.5\pm 43.51$, $*p=0.013$, test ANOVA une voie, $n=6$; Cx30^{-/-} AAV-GFP $D_1=179.2\pm 30.12$ vs Cx30^{-/-} AAV-GFP $D_5=308.3\pm 61.76$, $*p=0.024$, test ANOVA une voie, $n=3$; Cx30^{-/-} AAV-GFP-Cx30 $D_1=124.1\pm 14.27$ vs Cx30^{-/-} AAV-GFP-Cx30 $D_5=342.5\pm 57.49$, $*p=0.030$, test ANOVA une voie, $n=6$).

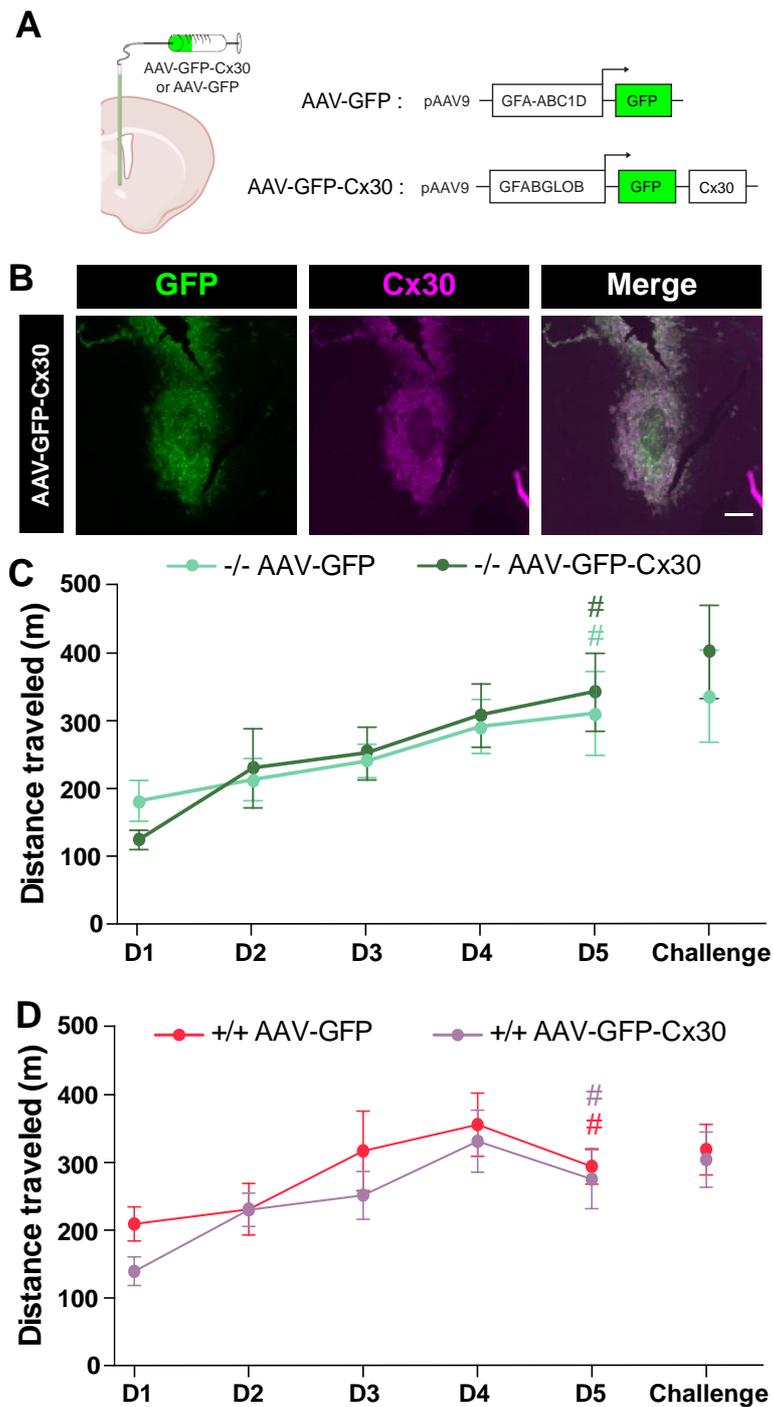


Figure 19 : Les seuls changements de niveaux de Cx30 dans le NAc ne modifient pas la sensibilisation locomotrice à la cocaïne. A. Schéma de l'expérience et des vecteurs viraux utilisés. B. Immunomarquage de la GFP et la Cx30 au site d'injection d'un vecteur viral AAV-GFP-Cx30, autour de la commissure antérieure, dans le NAc d'un animal contrôlé. Echelle : 300µm C. Mesures de la distance parcourue par les animaux déficients en Cx30 injectés avec un AAV permettant d'exprimer la Cx30 (-/- AAV-GFP-Cx30, n=3) ou d'un AAV contrôle (-/- AAV-GFP, n=6) dans les 30 minutes suivant l'injection de cocaïne, sur 5 jours consécutifs et lors d'une injection challenge 10 jours après la dernière injection. Les dièses, aux couleurs de la courbe à laquelle ils se réfèrent, représentent la différence entre la mesure au jour 5 et celle au jour 1, indicatifs d'une sensibilisation à la cocaïne (ANOVA une voie). D. Mesures de la distance parcourue par les animaux sauvages injectés avec un AAV permettant de

surexprimer la Cx30 (+/+ AAV-GFP-Cx30, n=6) ou d'un AAV contrôle (+/+AAV-GFP, n=6) dans les 30 minutes suivant l'injection de cocaïne, sur 5 jours consécutifs et lors d'une injection challenge 10 jours après la dernière injection. Les dièses, aux couleurs de la courbe à laquelle ils se réfèrent, représentent la différence entre la mesure au jour 5 et celle au jour 1, indicatifs d'une sensibilisation à la cocaïne (ANOVA une voie).

De ces résultats, nous pouvons conclure que la présence de Cx30 dans le NAc n'est pas un facteur nécessaire à l'augmentation de l'activité locomotrice induite par la cocaïne.

2.5. La morphologie des astrocytes est modifiée par la cocaïne de façon Cx30 dépendante

Rationnel : Des travaux récents du laboratoire montrent que les niveaux de Cx30 modifient la morphologie astrocytaire via les fonctions non canal de la Cx30, ce qui a des conséquences sur la neurotransmission (Pannasch et al., 2014). Ainsi, nous avons ici cherché à savoir ici si ces augmentations de Cx30 dans le NAc induites par la cocaïne ont des conséquences sur la morphologie des astrocytes. Une méthode pour quantifier la morphologie astrocytaire est l'utilisation de l'analyse dite de Sholl, qui nous permet de quantifier la ramification des astrocytes en évaluant le nombre de prolongements astrocytaires à distances définies du soma (Figure 20A).

Résultats : En utilisant cette méthode sur des souris dont les astrocytes expriment la eGFP (sous promoteur GFAP), nommées GFEC (cf. partie I de Matériels et Méthodes), nous avons quantifié la ramification des astrocytes de souris traitées à la cocaïne. Nous montrons ici que les astrocytes du NAc perdent en complexité morphologique et présentent une ramification réduite après administration de cocaïne (Figure 20C, à 10, 15 et 20 μm du soma, GFEC +/+ saline vs GFEC +/+ cocaïne :*, ***, ** respectivement, ANOVA deux voies à mesures répétées avec test post-hoc de Sidak de comparaisons multiples). De plus, nous avons noté que la cocaïne n'induit pas de changement de morphologie astrocytaire dans les souris déficientes en Cx30 (Figure 20B, GFEC -/- saline vs GFEC -/- cocaïne, $p=0.69$, ANOVA deux voies à mesures répétées). Par ailleurs, il est intéressant de noter que les astrocytes accumbaux déficients en Cx30 présentent en basal une arborisation plus développée que celle des astrocytes contenant de la Cx30 (Figure 20C, GFEC +/+ saline vs GFEC -/- saline, ** $p=0,0067$, ANOVA deux voies à mesures répétées). Par conséquent, après traitement à la cocaïne, les astrocytes accumbaux déficients en Cx30 présentent une morphologie plus complexe que celle des astrocytes de type sauvage (Figure 20B, GFEC +/+ cocaïne vs GFEC -/- cocaïne, *** $p<0.0001$, ANOVA deux voies à mesures répétées).

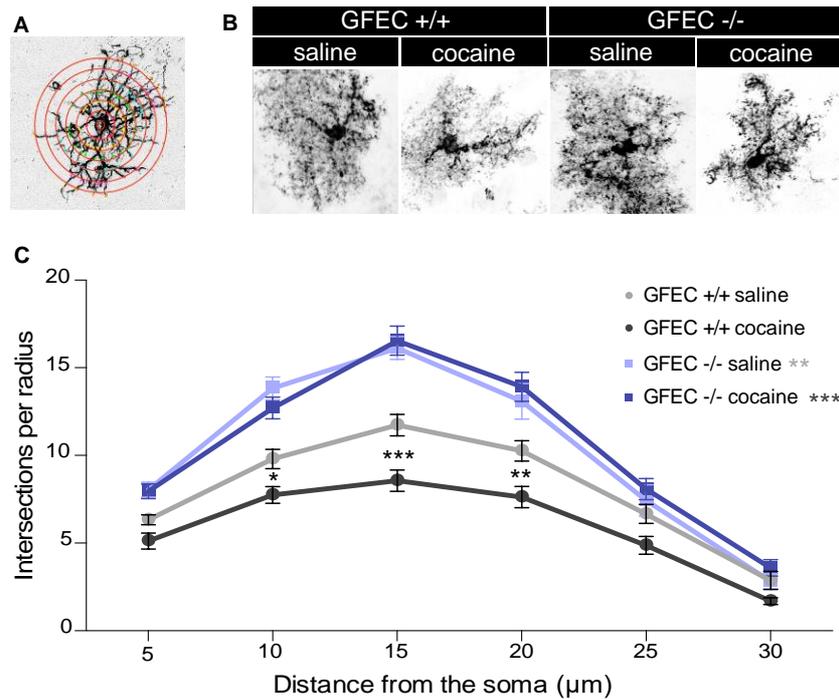


Figure 20 : La cocaïne induit des changements de morphologie astrocytaire dans le NAc des souris sauvages mais pas dans les souris déficientes en Cx30. A. Exemple de quantification de l'arborisation astrocytaire grâce à l'analyse de Sholl. B. Exemple d'astrocytes imagés dans les souris GFEC (GFEC+/+) ou GFEC déficientes en Cx30 (GFEC-/-) après injections de solution saline ou de cocaïne. C. Quantification de l'arborisation astrocytaire des 4 groupes étudiés (GFEC +/+ saline ou cocaïne et GFEC -/- saline ou cocaïne). Les étoiles grises claires associées au groupe GFEC -/- saline réfèrent à la comparaison avec le groupe GFEC +/+ saline (ANOVA deux voies à mesures répétées, **p=0.0067). Les étoiles grises foncées associées au groupe GFEC -/- cocaïne réfèrent à la comparaison avec le groupe GFEC +/+ cocaïne (ANOVA deux voies à mesures répétées, ***p<0.0001). Les étoiles noires présentées entre les courbes grises claires et foncées représentent la comparaison entre les groupes GFEC +/+ saline et GFEC +/+ cocaïne (ANOVA à deux voies à mesures répétées avec un test post-hoc de Sidak, n(GFEC +/+ saline)=15 cellules/3 animaux, n(GFEC +/+ cocaïne)=17 cellules/3 animaux, n(GFEC -/- saline)=24 cellules/3 animaux et n(GFEC -/- cocaïne)=23 cellules/3 animaux).

En conclusion, la cocaïne diminue l'arborisation astrocytaire, via un processus dépendant de la Cx30.

En mettant tous ces résultats en perspective, nous pouvons conclure que la cocaïne augmente les niveaux de Cx30 dans le NAc, ce qui diminue leur complexité morphologique.

2.6. La cocaïne modifie la couverture astrogliale des synapses excitatrices du NAc de façon Cx30-dépendante

Rationnel : Le laboratoire a précédemment montré que la Cx30 modifie la transmission glutamatergique dans l'hippocampe via des modifications de morphologie astrogliale résultant en un changement de couverture synaptique (Pannasch et al., 2014). Nous avons donc ici recherché si les modifications morphologiques des astrocytes du NAc que nous observées après injections de cocaïne (Figure 20) étaient également associées à un changement de couverture synaptique astrogliale.

Résultats : Pour ce faire, nous avons imagé la couverture des synapses excitatrices immunomarquées par les astrocytes sauvages dans les souris GFEC (GFAPCre-GFP) ou par les astrocytes déficients pour la Cx30 dans les souris GFEC-Cx30^{-/-} en utilisant la microscopie à super-résolution de type STED (Dr. David Mazaud au laboratoire). Nous avons ensuite réalisé une étude quantitative des distances les plus courtes entre les prolongements astrocytaires et ces synapses excitatrices (Figure 21A). Nous observons qu'après injections de cocaïne, les PAPs des souris sauvages sont plus proches des synapses excitatrices qu'après injections de solution saline (Figure 21B ^{+/+} saline vs ^{+/+} cocaïne, *** $p < 0.0001$, test de Kolmogorov-Smirnov et Figure 21C, short distance bins, * $p = 0.0156$, test de Wilcoxon). En revanche, cette différence n'est pas observée dans le NAc des animaux déficients en Cx30 (Figure 21B ^{-/-} saline vs ^{-/-} cocaïne, $p > 0.05$, test de Kolmogorov-Smirnov et Figure 21D, short distance bins, $p = 0.468$, test de Wilcoxon). Par ailleurs, il est intéressant de noter que les souris déficientes en Cx30 présentes des astrocytes dont les PAPs sont plus proches de la synapse que ceux observés dans les souris contrôles (Figure 21B, ^{+/+} saline vs ^{-/-} saline, *** $p < 0.0001$, test de Kolmogorov-Smirnov).

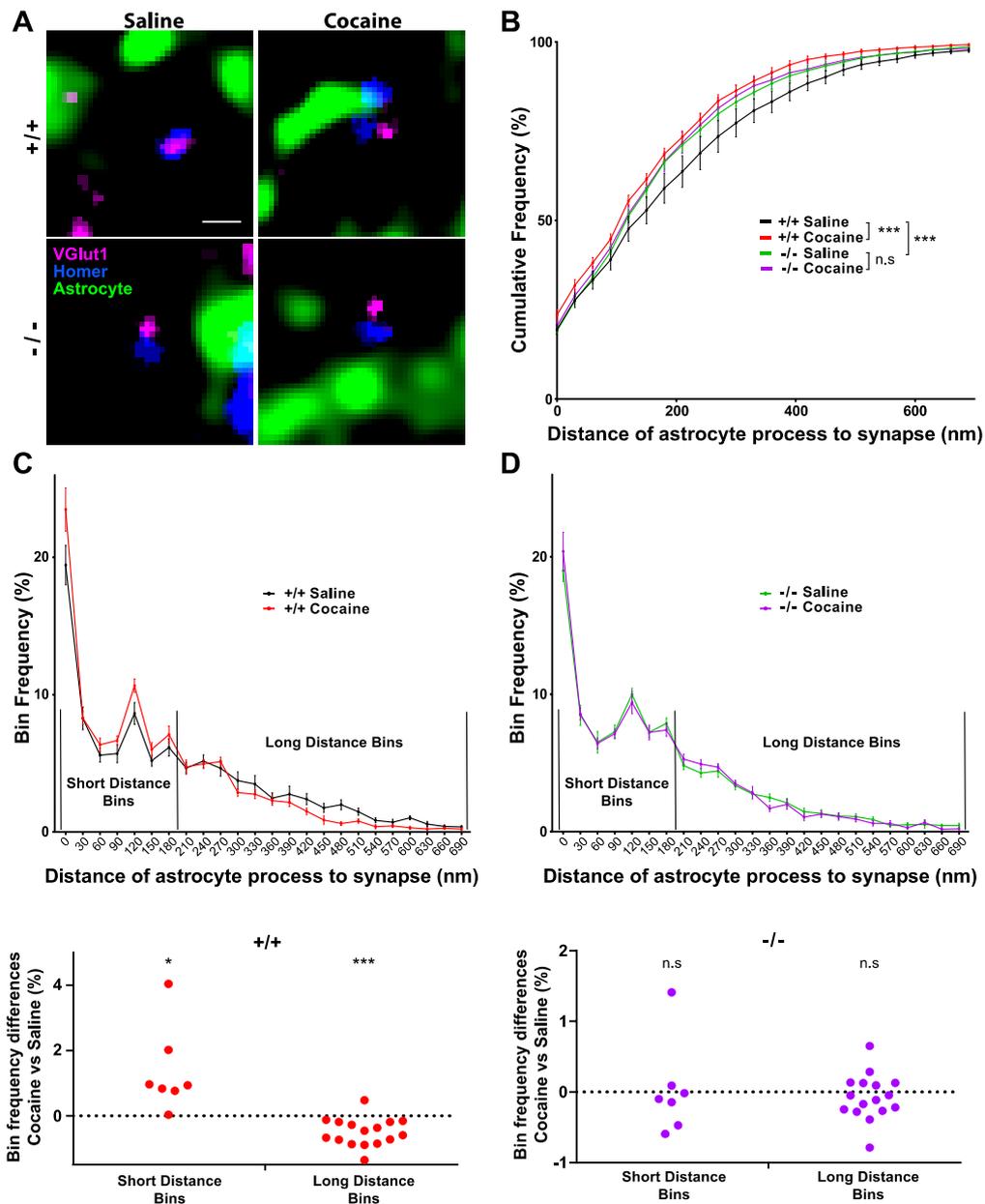


Figure 21 : La cocaïne induit un rapprochement des prolongements astrocytaires de la synapse dans le NAC de façon Cx30-dépendante. A. Images représentatives des quatre groupes étudiés (+/+ cocaïne et saline, -/- cocaïne et saline) avec le prolongement astrocytaire (GFP, vert) le marqueur présynaptique (VGlut1, magenta) et postsynaptique (Homer, bleu). Echelle: 250 nm. (Entre 4500 et 5000 synapses ont été analysées dans chaque groupe). B. Fréquences cumulatives des distances entre PAPs astrocytaires et synapses. Cette représentation montre une distribution significativement différente entre les conditions +/+ saline et +/+ cocaïne ($***p < 0.0001$, test de Kolmogorov-Smirnov, $n(+/+ \text{ saline}) = 11$ astrocytes (3 animaux), $n(+/+ \text{ cocaïne}) = 12$ astrocytes (3 animaux)), ainsi qu'entre les conditions +/+ saline et -/- saline ($***p < 0.0001$, test de Kolmogorov-Smirnov, $n(+/+ \text{ saline}) = 11$ astrocytes (3 animaux), $n(-/- \text{ saline}) = 12$ astrocytes (3 animaux)), mais pas entre les conditions -/- saline et -/- cocaïne ($p > 0.05$, test de Kolmogorov-Smirnov, $n(-/- \text{ saline}) = 12$ astrocytes (3 animaux), $n(-/- \text{ cocaïne}) = 12$ astrocytes (3 animaux)). C. Analyse des distributions des groupes +/+ saline et +/+ cocaïne en fréquence (pourcentage du total, haut) avec l'analyse des fréquences du groupe +/+ cocaïne comparés au groupe +/+ saline,

groupés en distances courtes et longues (0-200nm et 200-690nm respectivement). Les différences sont relatives au groupe +/- saline. Les fréquences du groupes +/- cocaïne sont supérieures à celles du groupe +/- saline dans les petites distances (*p=0.0156, test Wilcoxon) mais inférieures dans les grandes distances (**p<0.0001, test de Wilcoxon). **D.** Détails des distributions des groupes -/- saline et -/- cocaïne en fréquence (pourcentage du total, haut) avec l'analyse des fréquences du groupe -/- cocaïne comparés au groupe -/- saline, groupés en distances courtes et longues (0-200nm et 200-690nm respectivement). Les différences sont relatives au groupe -/- saline. Les fréquences du groupes -/- cocaïne sont équivalentes à celles du groupe -/- saline dans les petites et grandes distances (petites distances p=0.468, grandes distances p=0.348, test de Wilcoxon).

Aux vues de ces résultats, nous pouvons conclure d'une part que la cocaïne induit un rapprochement des PAPs aux synapses excitatrices dans le NAc, et d'autre part que l'absence de Cx30 induit un rapprochement des PAPs aux synapses excitatrices du NAc, inchangé par l'administration de cocaïne.

2.7. Induction d'une réactivité astrogliale par la cocaïne

Rationnel : Etant donné que la cocaïne induit une diminution de l'arborisation des prolongements des astrocytes du NAc, nous nous sommes posés la question de savoir si les astrocytes présentaient un profil réactif. En effet, lorsque les astrocytes deviennent réactifs, plusieurs changements morphologiques sont observés comme la perte de la polarité astrocytaire ou la rétraction des prolongements (Escartin et al., 2019). Pour cela, nous avons testé des immunomarqueurs typiques témoins de la réactivité astrocytaire tels que GFAP et vimentine. De plus, comme les changements morphologiques sont liés aux niveaux de Cx30, nous avons étudié les changements de niveau de ces mêmes marqueurs de réactivité (vimentine, GFAP) dans les souris déficientes en Cx30.

Résultats : Nous avons observé que les niveaux de vimentine et de GFAP sont augmentés après injections de cocaïne (Figure 22A-B, GFAP : saline=5.58±0.79 vs cocaïne=10.13±1.43, *p=0.035, tests de Mann-Whitney; vimentine : saline=1.13±0.08 vs cocaïne=4.75±0.85, **p=0.068, t-test non apparié, n(GFAP saline)=7 ROI, 3 animaux, n(GFAP cocaïne)=20 ROI, 3 animaux, n(vimentine saline)=8 ROI, 3 animaux, n(vimentine cocaïne)=16 ROI, 3 animaux).

Ces résultats nous indiquent que la cocaïne induirait une réactivité astrogliale dans le NAc.

Dans un second temps, nous avons évalué ces marqueurs de réactivité dans les souris déficientes en Cx30, et aucune différence significative n'est observable dans les niveaux de GFAP et de vimentine après administration de cocaïne, comparé aux niveaux observés après administration de solution saline (Figure 22C-D, GFAP : -/- saline=6.42±1.38 vs -/- cocaïne=4.38±1.12, p=0.18; vimentin : -/- saline=7.49±1.16 vs -/- cocaïne=4.17±0.93, p=0.13, tests de Mann-Whitney, n=6 ROI, 3 animaux dans tous les groupes).

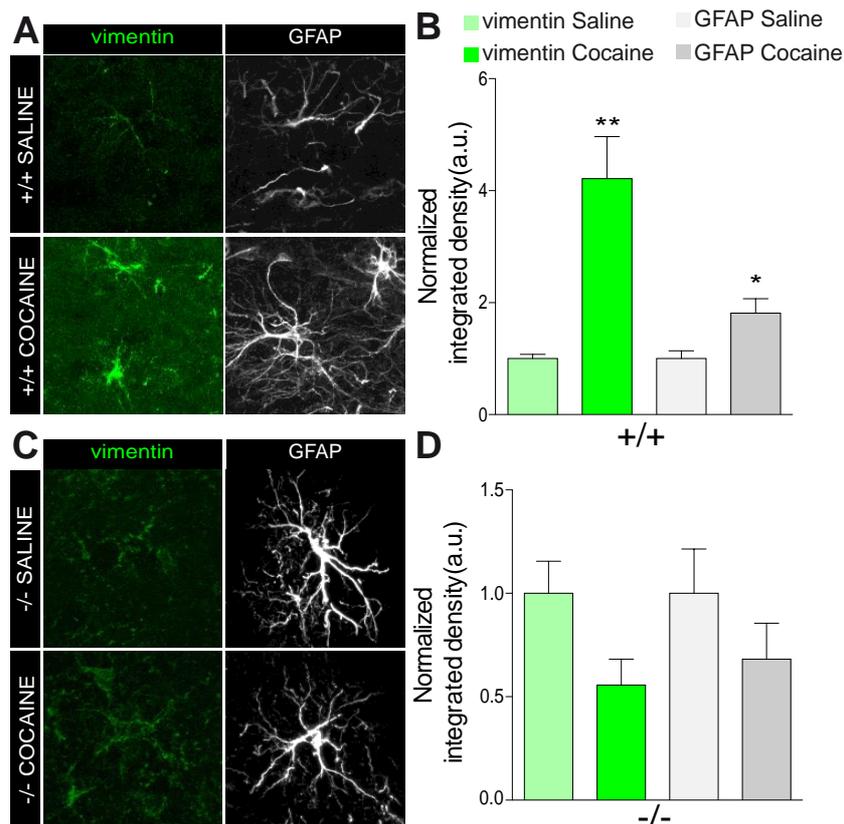


Figure 22 : La cocaïne induit une réactivité astrocytaire dans le NAc des souris sauvages, qui est Cx30-dépendante. A. Immunomarquages de marqueurs de réactivité après injections de solution saline ou cocaïne dans des souris sauvages. B. Quantification de la fluorescence des marquages comme illustrés en A, normalisées par la condition Cx30+/+ saline, la significativité statistique est en comparaison à la solution saline (tests de Mann-Whitney $**p=0.068$ et $*p=0.035$, respectivement, $n(\text{GFAP saline})=7$ ROI, 3 animaux, $n(\text{GFAP cocaïne})=20$ ROI, 3 animaux, $n(\text{vimentine saline})=8$ ROI, 3 animaux, $n(\text{vimentine cocaïne})=16$ ROI, 3 animaux). C. Immunomarquages de marqueurs de réactivité après injections de solution saline ou de cocaïne dans des souris déficientes en Cx30. D. Quantification de la fluorescence des marquages comme illustrés en C, normalisée par la condition Cx30 -/- saline, la significativité statistique est en comparaison à la solution saline (tests de Mann-Whitney $p=0.13$ et $*p=0.18$, respectivement, $n=6$ ROI, 3 animaux).

Nous pouvons donc en conclure que la cocaïne n'induirait pas de réactivité astrocytaire dans les souris déficientes en Cx30.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la cocaïne induirait une réactivité astrocytaire dans le NAc, et que ce processus est dépendant de la Cx30.

Cette dernière partie des résultats nous a particulièrement interloquée, car elle indique que les souris déficientes pour la Cx30 ne présentent pas de réactivité astrocytaire. Ces données suggèrent donc que la Cx30 pourrait contribuer à la réactivité des astrocytes. Il est aussi possible que la Cx30 participe aux modifications morphologiques induites par la cocaïne de manière plus qualitative que l'ensemble des modifications induites par une réactivité astrocytaire. C'est pourquoi nous avons donc décidé de conduire un nouveau projet sur le lien entre la Cx30 et la réactivité astrocytaire (cf. partie II).

Par ailleurs, nous nous sommes aussi demandées si la réactivité astrocytaire du NAc avait une influence sur l'activité locomotrice.

2.8. Réduire la réactivité des astrocytes du NAc des souris sauvages réduit l'activité locomotrice induite par la cocaïne

Rationnel : Nous avons montré que la cocaïne induit une réactivité astrocytaire dans le NAc, et que ce processus est dépendant de la Cx30. Nous nous sommes donc demandées dans un premier temps si la réactivité astrogliale induite par la cocaïne chez les souris sauvages contribue à l'effet locomoteur de la cocaïne. Cette hypothèse pourrait en effet suggérer que l'effet de la Cx30 sur la sensibilisation à la cocaïne pourrait être lié à sa régulation de la réactivité astrocytaire. Pour ce faire, nous avons utilisé un vecteur viral permettant d'inhiber la voie STAT3 via l'expression d'un inhibiteur endogène, SOCS3 (collaboration avec le Dr. Carole Escartin, MIRCen). Après avoir injecté de manière stéréotaxique ce vecteur viral spécifiquement dans le NAc (Figure 23A), nous avons effectué des mesures de l'activité locomotrice induite par la cocaïne.

Résultats : Nous avons observé que l'inhibition de la réactivité astrocytaire dans le NAc de souris sauvages n'empêche pas l'augmentation d'activité locomotrice induite par la cocaïne (Figure 23B, +/+ SOCS3-saline vs +/+ SOCS3-cocaïne, ** $p=0.0041$, ANOVA deux voies, $n=3$). En revanche, nous n'observons pas de sensibilisation à la cocaïne (+/+ SOCS3-cocaïne $D_1=108.8\pm 27.57$ vs +/+ SOCS3-cocaïne $D_5=206.5\pm 66.59$, $p=0.4$, test de Mann-Whitney, $n=3$). De plus, il est intéressant de noter que dans les souris injectées avec le virus SOCS3, l'effet locomoteur de la cocaïne est significativement plus faible que celui observé dans les souris sauvages (SOCS3-cocaïne vs +/+ cocaïne, ANOVA deux voies, * $p=0.02$, $n=3$ et 6 respectivement).

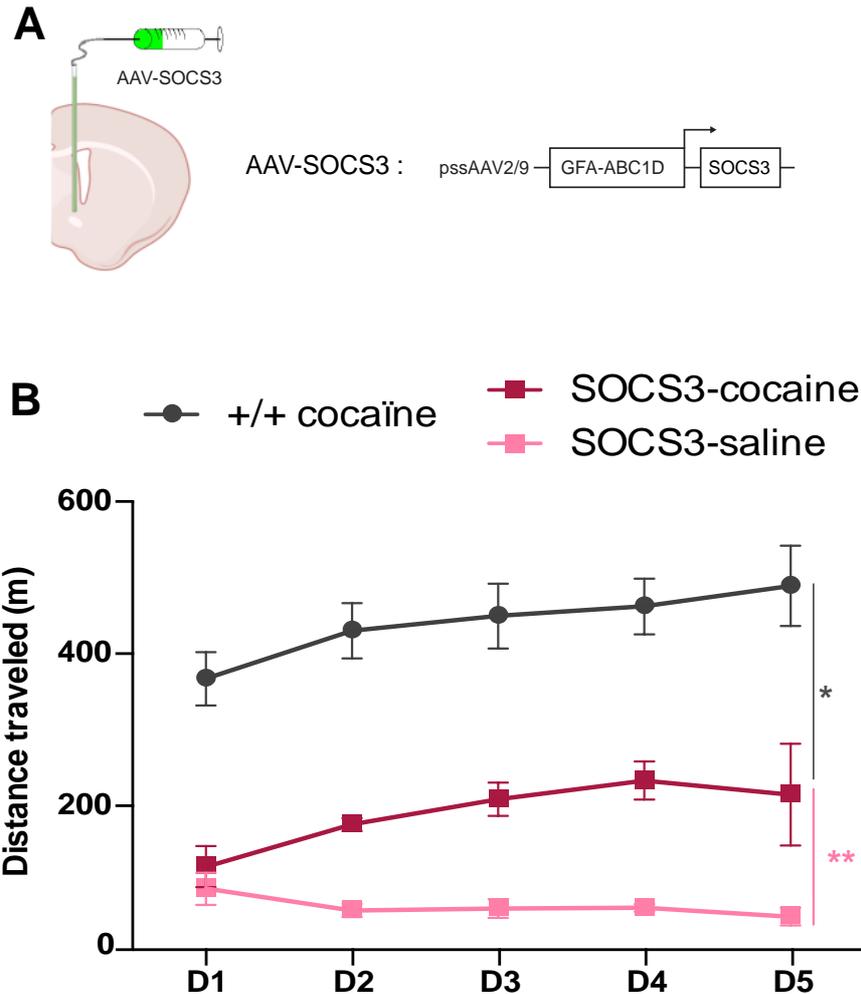


Figure 23 : Inhiber la réactivité astrocytaire dans le NAc réduit l'activité locomotrice induite par la cocaïne et supprime la sensibilisation à la cocaïne. A. Schéma de l'expérience et du vecteur viral utilisé. B. Mesures de la distance parcourue par les animaux sauvages (+ /+, n=6) ou injectés avec le vecteur viral SOCS₃, après injection de cocaïne (+/+ SOCS₃-cocaïne, n=3) ou de solution saline (+/+ SOCS₃-saline, n=3) dans les 30 minutes suivant l'injection de cocaïne sur 5 jours consécutifs. Les étoiles roses sur le côté sont relatives à la différence significative entre les courbes SOCS₃-saline et SOCS₃-cocaïne (ANOVA deux voies), les grises, représentent la différence entre les courbes SOCS₃-cocaïne et +/+ cocaïne (ANOVA deux voies).

De ces résultats, nous pouvons conclure que **la réactivité astrocytaire sous-tendue par la voie JAK-STAT₃ contribue à la mise en place d'une sensibilisation locomotrice à la cocaïne.**

2.9. La Cx30 régule la sensibilisation à l'amphétamine, qui contrôle également l'expression de la Cx30 et la morphologie des astrocytes

Rationnel : La cocaïne n'est pas la seule drogue addictive à activer les régions impliquées dans le circuit de la récompense. Une autre drogue d'intérêt dans les études visant à comprendre les mécanismes de l'addiction est l'amphétamine. En effet, l'amphétamine agit aussi sur le transporteur à la dopamine (DAT), en tant que faux substrat, afin d'augmenter les niveaux de dopamine synaptique et modifier la transmission dans le

NAc, la VTA et le PFC notamment (Kalivas, 2007; Lüscher & Ungless, 2006; Sulzer, 2011). L'action de l'amphétamine étant similaire à celle de la cocaïne et afin de déterminer si les résultats observés jusqu'à maintenant sont spécifiques à la cocaïne, il nous a semblé intéressant de nous pencher sur le rôle de la Cx30 dans la sensibilisation à l'amphétamine ainsi qu'en retour sur les effets de l'amphétamine sur les astrocytes du NAc. Nous avons ainsi d'abord mesuré l'activité locomotrice des animaux souris sauvages et déficientes en Cx30 après injections d'amphétamine, (collaboration KeyObs) (Figure 24A). Ensuite, nous avons observé si l'amphétamine induisait des changements d'expression de Cx30 dans le NAc. Enfin, nous avons effectué des analyses de Sholl sur des astrocytes accumbaux d'animaux sauvages (+/+, n=6) et déficients en Cx30 (-/-, n=8) après injections de solution saline ou d'amphétamine.

Résultats: Similairement à ce qui a été observé après une sensibilisation à la cocaïne, un protocole de sensibilisation à l'amphétamine induit une forte augmentation de l'activité locomotrice dans les animaux sauvages (Figure 24B, +/+ Amphétamine D1=93.09±13.92 vs +/+ Amphétamine D5= 284.4±73.97, **p=0.0028, test de Wilcoxon apparié, n=6). Cependant, l'activité locomotrice induite par l'amphétamine est beaucoup plus faible dans les animaux déficients en Cx30, en particulier à partir du 3^{ème} jour (Figure 24B, +/+ Amphétamine vs -/- Amphétamine, *p=0,026, ANOVA à deux voies, n=6 et 8 respectivement). Par ailleurs, contrairement à ce qui a été observé avec la cocaïne, ici, nous n'observons pas de sensibilisation à l'amphétamine dans les animaux déficients en Cx30 (Figure 24B, -/- Amphétamine D1=80.66±11.48 vs -/- Amphétamine D5=117.3±18.27, p=0.12, t-test apparié, n=8).

Nous pouvons donc conclure que la Cx30 est nécessaire pour la mise en place d'une sensibilisation à l'amphétamine.

Ensuite, à l'aide d'immunomarquages dans le NAc (Figure 24C), nous observons une augmentation des niveaux de Cx30 après injections d'amphétamine (Figure 24D, +/+ Amphétamine=23.89±1.43 vs -/- Amphétamine=29.43±2.12, *p=0.038, t-test non apparié, n= 6o et 6g respectivement (3 animaux)).

Nous concluons donc que l'amphétamine induit une augmentation des niveaux de Cx30 dans le NAc.

Enfin, nous avons analysé la morphologie des astrocytes grâce à une analyse de Sholl réalisée sur des astrocytes accumbaux d'animaux sauvages et déficients en Cx30. Cette analyse a révélé que, tout comme après des injections de cocaïne, la ramification des prolongements astrocytaires est réduite après injections d'amphétamine (+/+ Saline vs +/+ Amphétamine, ***p<0.0001, ANOVA à deux voies, n=11 et 9 respectivement). De plus, l'amphétamine ne modifie pas la ramification des prolongements d'astrocytes déficients en Cx30 (-/- Saline vs -/- Amphétamine, p=0.90, ANOVA à deux voies, n=17 et 19 respectivement). Enfin, nous notons également ici qu'en condition basale, les astrocytes déficients en Cx30 possède une morphologie plus complexe que ceux de souris sauvages (+/+ Saline vs -/- Saline, *p=0.021, ANOVA à deux voies, n=11 et 17 respectivement). Ainsi, l'injection d'amphétamine réduisant la complexité morphologique des astrocytes sauvages mais pas de ceux déficients en Cx30, la différence n'en est que plus importante entre ces deux groupes après injections d'amphétamine (+/+ Amphétamine vs -/- Amphétamine, ***p<0.0001, ANOVA à deux voies, n=9 et 19 respectivement).

En conclusion, comme la cocaïne, l'amphétamine diminue l'arborisation astrocytaire, via un processus dépendant de la Cx30.

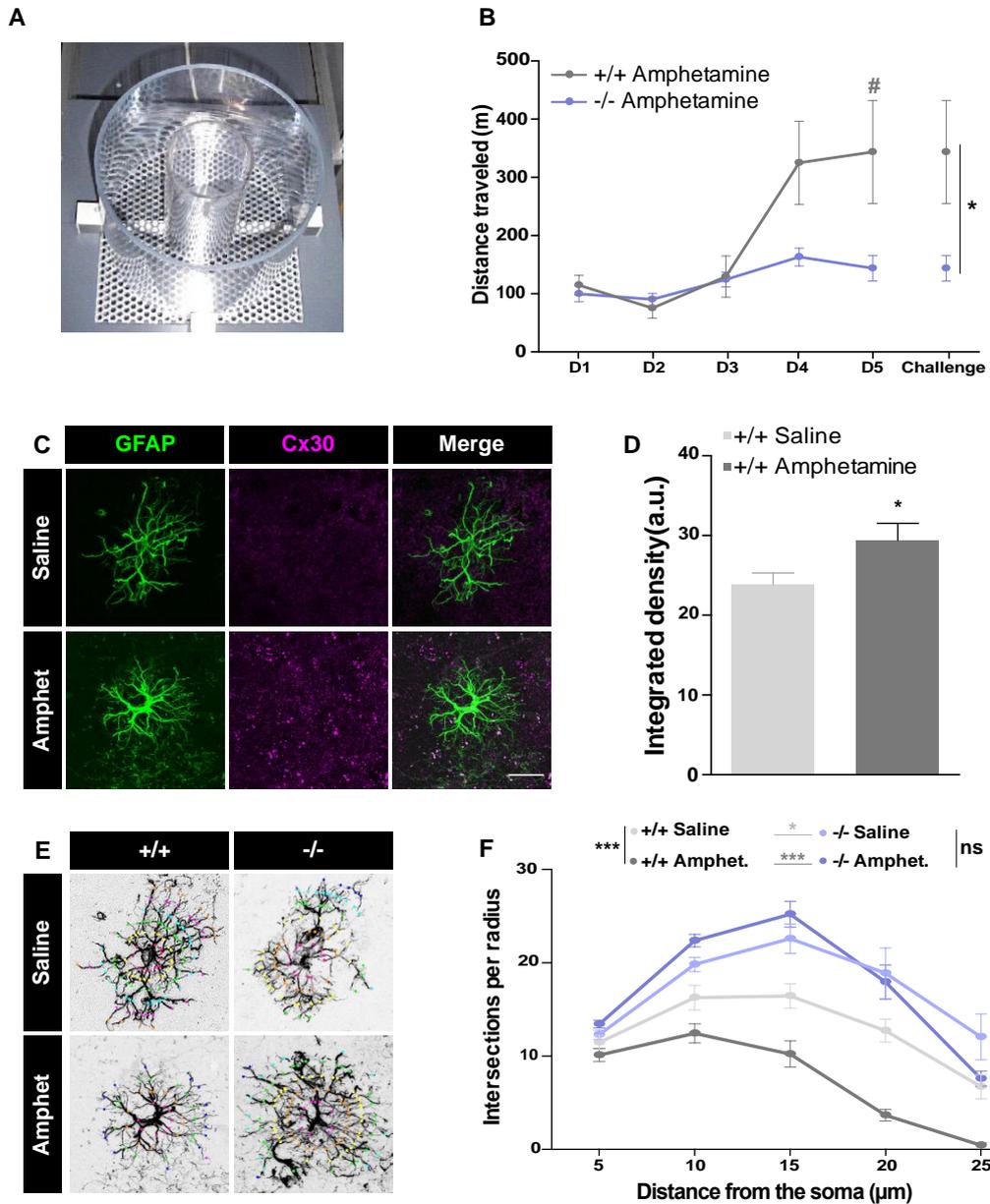


Figure 24 : La Cx30 est nécessaire à la sensibilisation à l'amphétamine, qui régule l'expression de la Cx30 et la morphologie des astrocytes du NAC. A. Photo d'un actimètre (couloir circulaire doté de quatre rayons infrarouges placés à 90° d'intervalles) utilisé pour la mesure l'activité locomotrice des animaux après injections d'amphétamine. B. Mesures de la distance parcourue par les animaux sauvages (+ /+, n=6) ou Cx30-/- (-/-, n=8) dans les 30 minutes suivant l'injection d'amphétamine, sur 5 jours consécutifs et lors d'une injection challenge 10 jours après la dernière injection. Les étoiles sur le côté sont relatives à la différence significative entre les courbes +/+ amphétamine et -/- amphétamine (ANOVA deux voies), les dièses, aux couleurs de la courbe à laquelle ils se réfèrent, représentent la différence entre la mesure au jour 5 et celle au jour 1, indicatifs d'une sensibilisation à la cocaïne (ANOVA une voie). C. Immunomarquage de Cx30 des astrocytes (cellules GFAP-positives) dans le NAC après injections d'amphétamine ou de solution saline. Echelle, 20 μm. D. Quantification de l'immunomarquage de la Cx30 dans des régions d'intérêt positives

à la GFAP (t-test non apparié, * $p=0.038$). E. Exemple d'astrocytes imagés dans les souris sauvages (+/+) ou déficientes en Cx30 (-/-) après injections de solution saline ou d'amphétamine. C. Quantification de l'arborisation astrocytaire des 4 groupes étudiés (+/+ saline ou amphétamine et -/- saline ou amphétamine). Les étoiles grises claires associées au groupe -/- saline réfèrent à la comparaison avec le groupe +/+ saline (ANOVA deux voies à mesures répétées, * $p=0.021$). Les étoiles grises foncées associées au groupe -/- amphétamine réfèrent à la comparaison avec le groupe +/+ amphétamine (ANOVA deux voies à mesures répétées, *** $p<0.0001$). Les étoiles noires présentées à gauche de la légende représentent la comparaison entre les groupes +/+ saline et +/+ amphétamine (ANOVA à deux voies à mesures répétées, *** $p<0.0001$, $n(+/+ \text{ saline})=11$ cellules/3 animaux, $n(+/+ \text{ cocaïne})=9$ cellules/3 animaux, $n(-/- \text{ saline})=17$ cellules/3 animaux et $n(-/- \text{ cocaïne})=19$ cellules/3 animaux).

L'ensemble de ces résultats indique que ***la Cx30 est nécessaire à l'induction d'une sensibilisation locomotrice à l'amphétamine et que l'amphétamine augmente les niveaux de Cx30, ce qui a pour effet de diminuer la complexité morphologique des astrocytes du NAc.***

Afin de mieux comprendre la contribution de la Cx30 astrogliale dans la sensibilisation aux drogues, et en particulier dans le cas de la cocaïne, nous nous sommes ensuite intéressées à son effet sur la transmission synaptique glutamatergique dans le NAc.

3. ROLE DE LA Cx30 ASTROCYTAIRE SUR LA NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE DANS LE NAC

Rationnel : Des travaux récents du laboratoire ont montré que la fonction non canal de la Cx30 contrôle la transmission glutamatergique dans l'hippocampe en altérant la morphologie des astrocytes et leur couverture des synapses (Pannasch et al., 2014). Nous avons montré que la fonction non canal de la Cx30 contrôle les effets locomoteurs de la cocaïne ainsi que la morphologie des astrocytes dans le NAc. Nous avons donc ici recherché si ces effets sont aussi associés à une altération de la transmission synaptique glutamatergique dans le NAc, connue pour sous-tendre la plasticité synaptique (Miguéns et al., 2008; Quintero, 2013) et les effets locomoteurs de la cocaïne (Kalivas, 2009). Pour ce faire, nous avons utilisé la technique du patch-clamp dans les neurones épineux moyens (MSNs) du NAc (Figure 25A) et avons effectué différents tests pour déterminer les niveaux de glutamate à la synapse et les modifications de plasticité, en comparant les quatre groupes (+/+ saline, +/+ cocaïne, -/- saline, -/- cocaïne).

3.1. Altérations des évènements spontanés

Rationnel : Un des aspects permettant d'étudier les modifications de neurotransmission induits par la cocaïne, est l'analyse des courants miniatures excitateurs postsynaptiques (mEPSCs). Ces courants résultent essentiellement de l'activation par le glutamate présynaptique libéré spontanément de récepteurs glutamatergiques de type AMPA. Ils permettent de donner des indications sur les niveaux de glutamate extracellulaire synaptique ainsi que sur le nombre de récepteurs postsynaptiques au glutamate. Il a notamment été montré que les mEPSCs des MSNs du NAc sont altérés après des protocoles d'administration de cocaïne (Pascoli et al., 2014). Ainsi, nous avons mesuré les mEPSCs des MSNs après administration de cocaïne, ou de solution saline, dans les souris sauvages et déficientes en Cx30.

Résultats : Après traitement à la cocaïne de souris sauvages, les mEPSCs des MSNs du NAc ont une amplitude identique, mais une fréquence diminuée par rapport à ceux du groupe contrôle (Figure 25B-C-D, Fréquence : +/+ saline=3.58±0.37 vs +/+ cocaïne=0.91±0.14, ***p<0.0001, t-test non apparié ; Amplitude : +/+ saline=18.15±1.81 vs +/+ cocaïne=17.68±1.24, p=0.85, t-test non apparié, n=14 et n=9 respectivement). ***Ces résultats suggèrent que la cocaïne diminue la concentration de glutamate synaptique, mais sans changement du nombre de récepteurs postsynaptiques***

Par ailleurs, dans le NAc des souris déficientes en Cx30, la cocaïne ne change ni l'amplitude des mEPSCs des MSNs, ni leur fréquence (Figure 25B-C-D, Fréquence : -/- saline=1.99±0.51 pA vs -/- cocaïne=2.45±0.56 pA, p=0.57, t-test non apparié ; Amplitude : -/- saline=20.55±1.30 pA vs -/- cocaïne=17.73±1.40 pA, p=0.17, t-test non apparié, n=8 et n=10 respectivement). ***Ces résultats suggèrent dans ce cas que la cocaïne n'altère ni le niveau de glutamate synaptique, ni le nombre de récepteurs postsynaptiques.***

Toutefois, il est important de noter qu'en condition basale (injection de solution saline), la fréquence des mEPSCs détectés dans les souris déficientes en Cx30 est diminuée

comparée à celle des mEPSCs des souris sauvages (Figure 25B-C-D, (+/+ saline vs -/- saline, * $p=0.019$, t-test non apparié), mais que leur amplitude est similaire (+/+ saline vs -/- saline, $p=0.37$, t-test non apparié). **Ces données suggèrent que les souris déficientes en Cx30 présentent une diminution des niveaux de glutamate synaptique mais pas de changement du nombre de récepteurs postsynaptiques.**

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la cocaïne modifie les niveaux de glutamate à la synapse, et que l'absence de Cx30 altère ces modifications.

Ainsi, après avoir analysé les activations spontanées des récepteurs AMPA, nous avons investigué l'activation spontanée des récepteurs NMDA.

3.2. Modifications des niveaux de glutamate ambiant et libéré

Rationnel : Les récepteurs NMDA sont activés en conditions basales par le glutamate ambiant. Ainsi, leur activation spontanée est dépendante de la concentration de glutamate ambiant. Afin d'investiguer les niveaux de glutamate ambiant, nous utilisons un antagoniste compétitif des récepteurs NMDA, le 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP), dont l'application dans le milieu extracellulaire induit une réduction des courants toniques NMDA. Cette réduction induite par le CPP est inversement proportionnelle aux niveaux de glutamate ambiant.

Résultats : Nous avons enregistré par patch-clamp en mode de potentiel imposé (voltage-clamp) et en absence de toute stimulation le courant généré dans un MSN du NAc par un maintien du potentiel de membrane de la cellule à + 40 mV (holding current), courant qui est sous-tendu par l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate ambiant. Nous avons mesuré l'amplitude de ce courant tonique NMDA avant et après application du CPP (Figure 25E). Nous n'avons pas observé de modification significative de ce courant par la cocaïne ni chez les souris contrôle, ni chez les souris déficientes en Cx30, malgré une tendance à une diminution (Figure 25E, +/+ saline= 45.19 ± 9.14 pA vs +/+ cocaïne= 27.48 ± 6.97 pA, ns avec ANOVA une voie et test de Tukey post-hoc, $n=10$ et $n=6$ respectivement ; -/- saline= 34.78 ± 8.53 pA vs -/- cocaïne= 23.25 ± 5.41 pA, ns avec ANOVA une voie et test de Tukey post-hoc, $n=5$ et $n=10$ respectivement).

De ces résultats, nous pouvons conclure que la cocaïne n'induit pas de changement significatif de glutamate ambiant aux synapses glutamatergiques, ni dans les souris sauvages ni dans les souris déficientes en Cx30.

Après nous être intéressées aux activations spontanées des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA, nous allons maintenant étudier les activations évoquées de ces récepteurs, modifiées après administration de cocaïne.

Rationnel : Afin de quantifier les niveaux de glutamate libéré par le neurone présynaptique, nous mesurons les courants postsynaptiques glutamatergiques des MSNs en réponse à des stimulations synaptiques avant et après application d'une concentration non saturante (500 μ M) d'un antagoniste compétitif des récepteurs au glutamate de type AMPA, le gamma-D-Glutamylglycine (γ -DGG). Le γ -DGG fait donc la compétition avec le glutamate pour se lier aux récepteurs AMPA. Nous mesurons ainsi le pourcentage

d'inhibition de la réponse glutamatergique postsynaptique induite par le γ -DGG (Figure 25F), qui est inversement proportionnelle à la concentration de glutamate à la synapse.

Résultats: Nous avons observé que le pourcentage d'inhibition du courant postsynaptique excitateur par le γ -DGG est plus fort après traitement à la cocaïne chez les souris sauvages (Figure 25F-G, +/+ saline=33.26±5.32 % vs +/+ cocaïne=51.13±5.32 %, *p=0.035, t-test non apparié, n=9 et n=7 respectivement), ce qui indique que la cocaïne induit une diminution du glutamate synaptique. De façon remarquable, cet effet du γ -DGG n'est pas retrouvé dans les MSNs des souris déficientes en Cx30 (Figure 25F-G, -/- saline=38.46±8.38% vs -/- cocaïne=36.86±4.46%, p=0.83, test de Mann-Whitney, n=5 et n=4 respectivement).

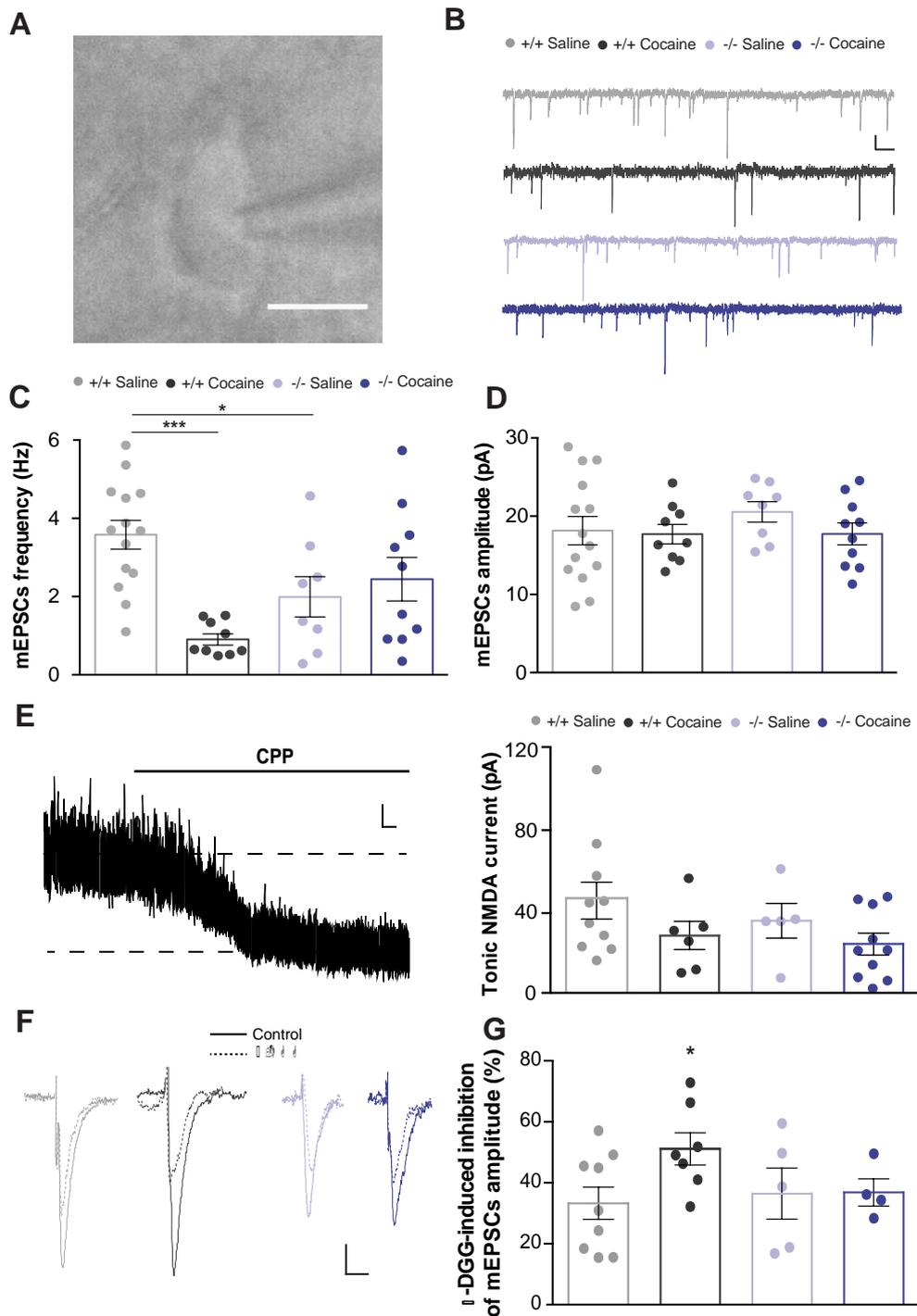


Figure 25 : Altération de la transmission synaptique glutamatergique induite par la cocaïne sur les MSNs du NAc sous-tendue par l'absence de Cx30. A. Illustration de l'expérience de patch sur un MSN du NAc. B. Traces de mEPSCs. Echelle 250ms, 10pA. C-D. Quantifications des fréquences (C) et amplitudes (D) des mEPSCs illustrés en B (t-tests non appariés, n(+/+ saline)=14, n(+/+ cocaïne)=9, n(-/- saline)=8, n(-/- cocaïne)=10). E. Exemple de traces (gauche) et quantification (droite) des courants NMDA toniques évalués par application de CPP. (ANOVA une voie, n(+/+ saline)=10, n(+/+ cocaïne)=6, n(-/- saline)=5, n(-/- cocaïne)=10). Echelle 25s, 10pA. F. Illustration des réponses induites à -70mV, avant (continu) et après (pointillé) application de γ -DGG, échelle 50ms, 50pA. G. Quantification du

pourcentage d'inhibition induit par l'application de γ -DGG comme illustré en F (t-tests non appariés, n(+/+ saline)=9, n(+/+ cocaïne)=7, n(-/- saline)=5, n(-/- cocaïne)=4).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la cocaïne n'induit pas de changement de glutamate ambiant aux synapses glutamatergiques des MSNs, mais diminue celle du glutamate synaptique induit par stimulation. En revanche, l'absence de Cx30 inhibe toute modification des niveaux de glutamate, ambiant ou libéré, induit par la cocaïne.

La cocaïne n'induit pas seulement une modification de la transmission glutamatergique dans le NAc, mais aussi des changements des niveaux de dopamine. Nous avons donc recherché si la Cx30 altère également les niveaux de dopamine.

4. INFLUENCE DE LA Cx30 ASTROCYTAIRE DU NAc SUR LES NIVEAUX DE DOPAMINE

Rationnel : Dans ce projet, nous avons choisi d'étudier l'influence de la Cx30 sur les mécanismes de sensibilisation à la cocaïne, via sa contribution sur la transmission glutamatergique. Or dans le NAc, les synapses glutamatergiques ne sont pas seulement tripartites (avec les astrocytes comme troisième acteur), mais aussi quadripartites, car sous l'influence de la libération de dopamine (Cooper et al., 2017). Ainsi, nous avons décidé d'évaluer les niveaux de dopamine dans le NAc et leurs changements induits par l'administration de cocaïne, afin de déterminer si la Cx30 régule également les niveaux de dopamine dans le NAc. Pour ce faire, nous avons mesuré les ratios DOPAC/DA dans des lysats de NAc, puis nous avons mesuré les concentrations de dopamine extracellulaires à l'aide d'une technique de microdialyse *in vivo*.

4.1. Quantification des niveaux DOPAC/Dopamine à partir de lysats de NAc

Rationnel : En collaboration avec le Dr. Jean-Pol Tassin de l'IBPS à Paris, nous avons calculé les ratios DOPAC/DA par HPLC dans des lysats de NAc (le ratio est calculé à partir des niveaux relatifs de DOPAC et DA, élucidés par HPLC comme illustré dans la figure 26A). Le DOPAC est le principal métabolite de la DA, synthétisé une fois que la DA est capturée par les neurones (Simansky, Bourbonais, & Smith, 1985; G. P. Smith, Bourbonais, Jerome, & Simansky, 1987). Ce ratio représente un indice métabolique de l'activité dopaminergique.

Résultats : Après un traitement de sensibilisation à la cocaïne, le ratio DOPAC/DA est réduit dans le NAc, comparé à celui des souris contrôles injectées avec une solution saline (Figure 26B, saline+/+=0.27±0.02 vs cocaïne+/+=0.18±0.02, **p=0.0038 avec le test de Mann-Whitney, n=6 et n=9 respectivement), ce qui indique une diminution des niveaux de DOPAC et/ou d'une augmentation de ceux de DA. En revanche, dans les souris déficientes en Cx30, ce ratio n'est pas modifié (-/-saline=0.24±0.01 vs -/-cocaïne=0.26±0.01, p=0.25 avec le test de Mann-Whitney, n=6 et n=5, respectivement).

Nous avons donc observé dans les animaux déficients en Cx30, que les changements du ratio DOPAC/DA induits par la cocaïne étaient modifiés après un protocole de sensibilisation à la cocaïne. Nous nous sommes donc posées la question de savoir si ces changements étaient présents dès la première injection, ou s'ils sont dus à la sensibilisation de l'animal à la drogue. Ainsi, nous avons donc effectué les mêmes mesures mentionnées ci-avant, mais cette fois-ci après une seule injection de cocaïne.

Dans les lysats de NAc, nous n'avons pas observé de modifications du ratio DOPAC/DA entre les souris C30+/+ et Cx30-/-, après une seule injection de cocaïne (Figure 26C, +/+ = 0.19±0.02 vs -/- = 0.17±0.02, p = 0.63, test de Mann-Whitney, n=3).

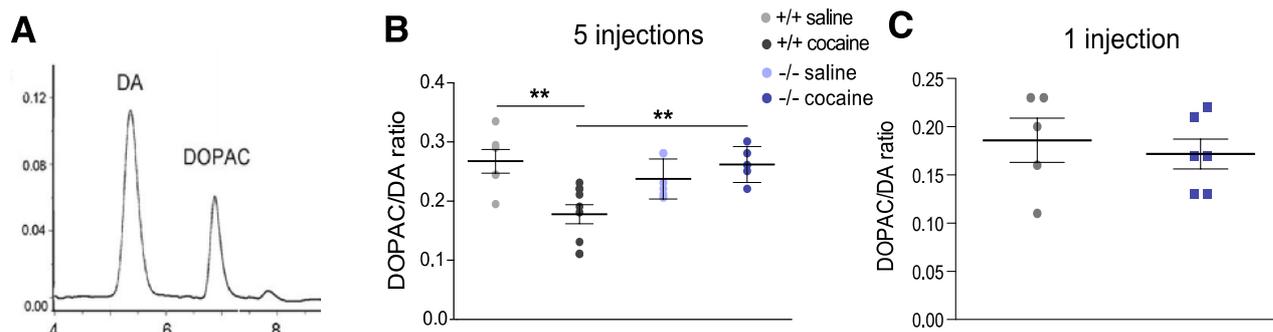


Figure 26 : Modifications du ratio DOPAC/DA dans le NAc après un protocole de sensibilisation à la cocaïne dans les souris sauvages et déficientes en Cx30. A. Illustration du résultat d'une HPLC, les pics représentent les concentrations de monoamines, séparés dans le temps en fonction de leur taille. La taille des pics est ensuite mesurée et le ratio DOPAC/DA est calculé. *Modifié d'après Ming et al., 2009.* B. Quantifications du ratio DOPAC/DA à partir de lysats de NAc, prélevés après le protocole de sensibilisation à la cocaïne (tests de Mann-Whitney, $n(+/+ \text{ saline})=6$, $n(+/+ \text{ cocaïne})=9$, $n(-/- \text{ saline})=6$, $n(-/- \text{ cocaïne})=5$).

Ainsi, de ces résultats, nous pouvons conclure que l'utilisation de la dopamine est réduite dans le NAc en l'absence de Cx30, après un protocole de sensibilisation à la cocaïne.

4.2. Quantification des niveaux de dopamine dans le cortex préfrontal

Rationnel : Le cortex préfrontal étant la deuxième aire du cerveau la plus ciblée par les afférences dopaminergiques de la VTA après le NAc, nous avons aussi investigué les éventuelles modifications de niveaux de DA en l'absence de Cx30, afin de savoir si les changements observés dans le NAc sont spécifiques à cette région, ou, si toutes les aires d'afférences dopaminergiques exhibent des changements similaires. Nous avons donc effectué des expériences d'HPLC à partir de lysats de PFC, pour mesurer l'utilisation de la dopamine induite par la cocaïne.

Résultats : Tout comme dans le NAc, nous observons une réduction du rapport DOPAC/DA dans les souris sauvages après 5 injections de cocaïne (Figure 27A, $+/+ \text{ saline}=0.91\pm 0.09$ vs $+/+ \text{ cocaïne}=0.58\pm 0.09$, $*p=0.03$, t-test non apparié, $n=6$ et $n=8$ respectivement). En revanche, cette diminution n'est pas observable dans le NAc des souris déficientes en Cx30 (Figure 27A, $-/- \text{ saline}=0.62\pm 0.16$ vs $-/- \text{ cocaïne}=0.83\pm 0.08$, $p=0.16$, test de Mann-Whitney, $n=5$ et $n=7$ respectivement). Aussi, si le ratio DOPAC/DA observé après cinq injections de solution saline est similaire dans les deux génotypes (Figure 27A, $+/+ \text{ saline}=0.91\pm 0.09$ vs $-/- \text{ saline}=0.62\pm 0.16$, $p=0.18$, test de Mann-Whitney, $n=6$ et $n=5$ respectivement), il en est de même après 5 injections de cocaïne, même si dans ce dernier cas de figure, une tendance à l'augmentation de ce ratio est notable dans les souris Cx30-/- comparé à celui des souris Cx30+/+ (Figure 27A, $+/+ \text{ cocaïne}=0.58\pm 0.09$ vs $-/- \text{ cocaïne}=0.83\pm 0.08$, $p=0.07$, test de Mann-Whitney, $n=8$ et $n=7$ respectivement).

En revanche, après une injection de cocaïne, le ratio DOPAC/DA observé dans les souris déficientes en Cx30 est significativement plus bas que celui mesuré dans le PFC des

souris sauvages (Figure 27B, $+/+$ cocaïne= 0.49 ± 0.03 vs $-/-$ cocaïne= 0.21 ± 0.04 , $**p=0.0079$, test de Mann-Whitney, $n=5$).

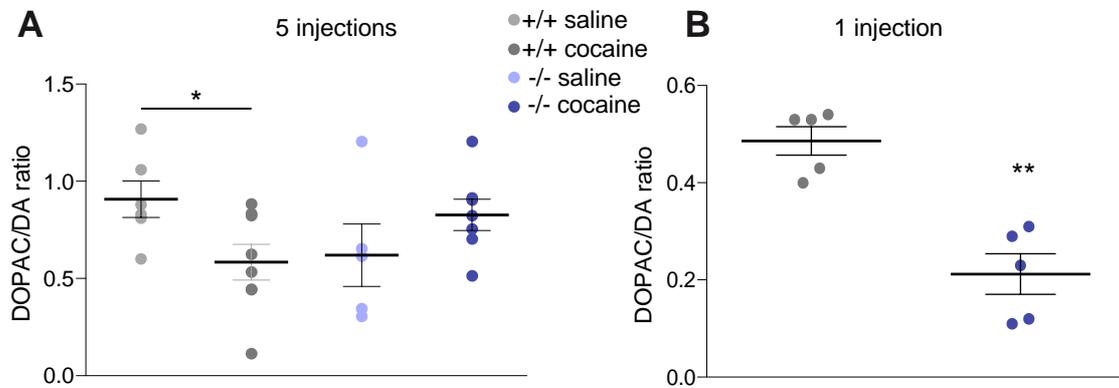


Figure 27 : Modifications du ratio DOPAC/DA dans le PFC. A. Quantifications du ratio DOPAC/DA à partir de lysats de PFC, prélevés après le protocole de sensibilisation à la cocaïne (tests de Mann-Whitney, $n=5-7$). B. Ratio DOPAC/DA des lysats de PFC après une injection de cocaïne (test de Mann-Whitney, $**p=0.0079$, $n=5$). C. Ratio DOPAC/DA des lysats de NAc après une injection de cocaïne (test de Mann-Whitney, $p=0.63$, $n(+/+)=5$ et $n(-/-)=6$).

De ces résultats, nous concluons que la Cx30 régule l'utilisation de la dopamine induite par la cocaïne et cet effet est visible dès la première injection de cocaïne. De plus, ces changements ne sont pas spécifiques du NAc puisqu'ils sont aussi détectés dans le cortex préfrontal.

Ces résultats provenant de lysats du tissu complet, milieux intra- et extracellulaires sont pris en compte. Ceci ne nous permet donc pas de savoir quelle partie du cycle de la dopamine est altérée par l'absence de Cx30 : libération, capture ou métabolisation. Nous avons donc procédé à des mesures de la dopamine extracellulaire par microdialyse *in vivo*.

4.3. Quantification des niveaux de dopamine extracellulaire dans le NAc

Rationnel : Pour découvrir quel aspect de l'utilisation de la dopamine est modifié par l'absence de Cx30, nous avons collaboré avec le Dr. Bruno Guiard du CRCA à Toulouse pour réaliser des microdialyses de fluide cérébrospinal du NAc *in vivo*. Ainsi, à l'aide de la technique d'HPLC, nous pouvons calculer les concentrations de dopamine dans le NAc des souris sauvages et déficientes en Cx30 avant et après injections de cocaïne, sur 5 jours consécutifs (Figure 28A).

Dès la première injection, nous avons observé que l'augmentation des niveaux de dopamine suite à l'injection de cocaïne était plus faible dans les souris déficientes en Cx30 que celle observée dans les souris sauvages, comme l'atteste le calcul du niveau de dopamine libéré après traitement à la cocaïne (Figure 28A, $+/+$ = 22 ± 1.12 vs $-/-$ = 10.76 ± 2.06 , $**p=0.0079$, test de Mann-Whitney, $n=5$).

Par ailleurs, après un protocole de sensibilisation à la cocaïne, nous avons observé que l'augmentation des niveaux de dopamine suite à l'injection de cocaïne était plus faible dans les souris déficientes en Cx30, comme l'atteste le calcul de libération de dopamine post-traitement, au jour 5 (Figure 28B, $+/+ = 36.93 \pm 2.29$ pg/ μ L vs $-/- = 9.68 \pm 1.36$ pg/ μ L, $***p < 0.0001$, test de Mann-Whitney, $n=4$).

De plus, ces mesures nous ont aussi permis d'observer que la concentration basale de dopamine extracellulaire était plus faible dans les souris déficientes en Cx30 que celle observée dans les souris sauvages, et ce dès le premier jour (données non montrées, calculées par la moyenne des données entre t15 et t60, concentration basale après 1 injection $+/+ = 2.96 \pm 0.17$ pg/ μ L vs concentration basale $-/- = 1.61 \pm 0.20$ pg/ μ L, $**p = 0.0079$, test de Mann-Whitney). Cette différence est toujours observable au 5^{ème} jour (données non montrées, calculées par la moyenne des données entre t15 et t60, concentration basale après 5 injections $+/+ = 4.62 \pm 0.34$ pg/ μ L vs concentration basale $-/- = 1.42 \pm 0.26$ pg/ μ L, $*p = 0.016$, test de Mann-Whitney).

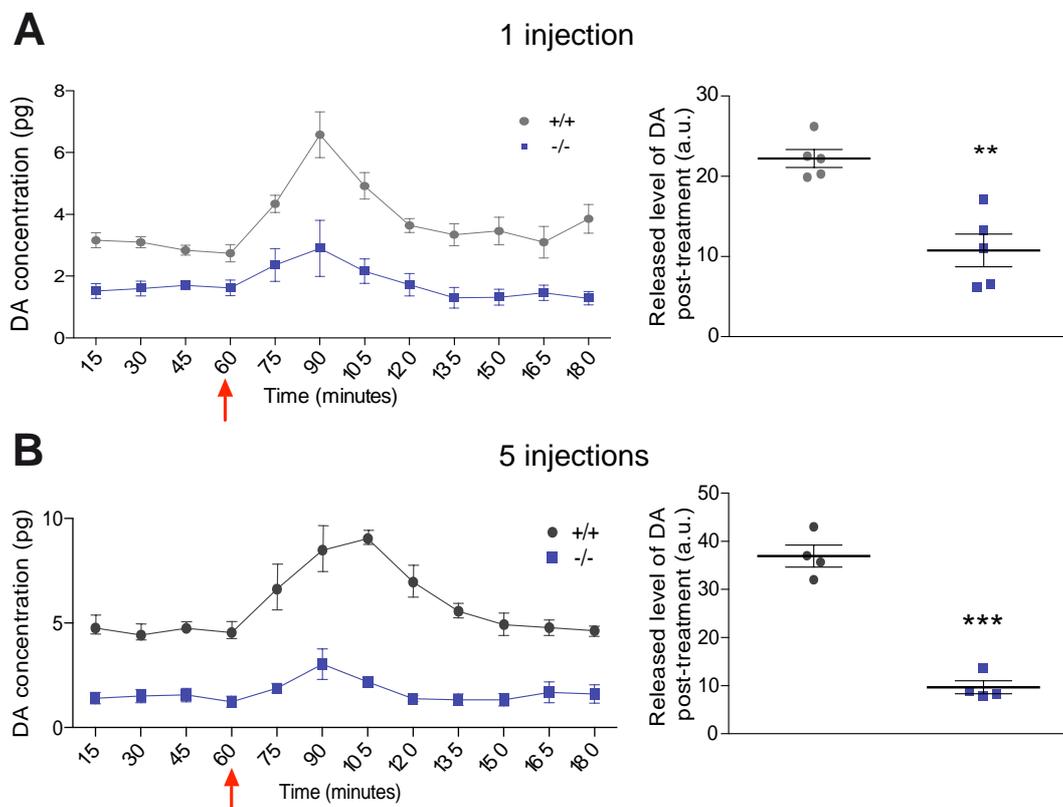


Figure 28 : Modifications des niveaux de dopamine dans le NAc induits par la cocaïne dans les souris sauvages et déficientes en Cx30. A. Concentration de DA dans le NAc des souris sauvages et déficientes en Cx30, avant et après une seule injection de cocaïne (notée par la flèche rouge, gauche) et quantification des libérations de dopamine post-traitement (droite) au niveau du pic de DA (entre t=60min et t=120min, $+/+$ vs $-/-$, $**p = 0.0079$, test de Mann-Whitney, $n=5$). B. Concentration de DA dans le NAc des souris sauvages et déficientes en Cx30, avant et après injection de cocaïne (notée par la flèche rouge), au 5^{ème} jour d'injection consécutif (gauche) et quantification des libérations de dopamine post-traitement (droite) au niveau du pic de DA (entre t=60min et t=120min, $+/+$ vs $-/-$, $***p < 0.0001$, test de Mann-Whitney, $n=4$).

De ces résultats, nous concluons que l'absence de Cx30 réduit le niveau basal de DA extracellulaire ainsi que l'augmentation de DA extracellulaire générée par une injection de cocaïne, et ce dès la première injection. En conclusion, les niveaux de DA sont modifiés en absence de Cx30, ce qui réduit l'action de la cocaïne sur le changement de DA extracellulaire.

En conclusion, nous avons établi dans ce projet que la Cx30 contribue à l'augmentation de l'activité locomotrice induite par la cocaïne, et ce par une fonction non canal. Ensuite, nous avons montré que la cocaïne induisait des augmentations des niveaux de Cx30 dans le NAc, de manière non transcriptionnelle et via un mécanisme dépendant de l'activité calcique intracellulaire astrocytaire. Ces augmentations de niveau de Cx30 induisent une rétraction des prolongements astrocytaires. De plus, l'absence de Cx30 empêche la mise en place de la plasticité synaptique glutamatergique des MSN du NAc, et induit une réduction des niveaux de dopamine dans le NAc.

Enfin, la cocaïne induit aussi un profil réactif des astrocytes du NAc des souris sauvages, mais pas dans les souris déficientes en Cx30. Or nous savons que la réactivité astrocytaire s'accompagne d'un ensemble de modifications morphologiques et fonctionnelles, qui ont des conséquences sur la neurotransmission (Coulter & Eid, 2012; Escartin et al., 2019; Nakagawa, Yabe, & Schwartz, 2005; Wanner et al., 2008). Ainsi, certaines de nos observations sur les modifications astrocytaires induites par la cocaïne pourraient être liées au phénotype réactif des cellules. Nous nous sommes donc intéressées dans un nouveau projet au lien existant entre la réactivité astrocytaire et la Cx30.

PARTIE III : RÉACTIVITÉ ASTROGLIALE ET CONNEXINE 30 : UNE BOUCLE POSITIVE DE RETROCONTROLE

1. LA Cx30 EST AUGMENTEE EN CONDITIONS REACTIVES, ET LA REACTIVITE EST ALTEREE PAR L'ABSENCE DE Cx30

Rationnel : Dans le projet présenté précédemment, nous avons observé que la cocaïne induit une augmentation de l'expression de la Cx30 (Fig.15). Nous avons aussi montré que la cocaïne induit une réactivité des astrocytes du NAc et que cet effet est inhibé dans les astrocytes déficients pour la Cx30 (Fig. 22)

Dans ce projet, nous avons donc recherché de façon plus globale et au-delà de l'exposition à la cocaïne, l'existence d'un lien entre la réactivité astrocytaire et l'expression de la Cx30 dans plusieurs conditions pathologiques. Dans un second temps, nous avons investigué si la Cx30 contribue directement à l'induction de la réactivité astrocytaire dans différents modèles de pathologies.

1.1. Modèle de blessure *in vivo*

Dans le cadre d'un projet développé au sein de l'équipe (thèse du Dr. Laure-Elise Pillet), il avait été noté une augmentation de l'expression de la Cx30 au niveau d'une blessure effectuée de manière aigüe *in vivo* (Figure 29B-C, Cx30 +/-control=1.00±0.10 vs +/- wound=2.02±0.2, ***p<0.0001, t-test non apparié, n=20 ROI, 3 animaux). Ce modèle consiste à brièvement insérer une canule dans le cerveau d'une souris afin de créer une blessure (Figure 29A, modèle wound), il est notamment utilisé pour l'étude de la formation de la cicatrice gliale dans le tissu (Dellavalle, Hempel, Kurtzhals, & Penkowa, 2010; D. Li et al., 2017). Par ailleurs, nous avons constaté qu'il existe une réactivité au niveau de la blessure, comparé à une zone contrôle, comme le montre plusieurs marqueurs caractéristiques (Figure 29A-C, graphiques gris clairs et gris foncés, STAT3 +/- control = 4.36 ± 0.24 vs +/- wound = 8.52 ± 0.35, ***p=0.0001, test de Kruskal-Wallis avec test post-hoc de Dunn, n=40 ROI (3 animaux) et n=30 ROI (3 animaux) respectivement. GFAP +/- control=0.92±0.14 vs +/- wound=1.82±0.11, *p=0.011, ANOVA une voie avec test post-hoc de Tukey, n=14 ROI (3 animaux) et n=28 ROI (3 animaux) respectivement. Iba1 +/- control=1.08±0.15 vs +/- wound=2.20±0.10, ***p<0.0001, test ANOVA une voie avec test post-hoc de Tukey, n=26 ROI (3 animaux) dans les deux groupes).

Nous pouvons donc conclure que dans le modèle de blessure aigüe in vivo, il y a au niveau de la blessure une augmentation à la fois de l'expression de la Cx30 et de la réactivité des astrocytes.

Ces résultats suggèrent donc une corrélation entre le niveau de Cx30 et la réactivité astrocytaire dans le modèle de la blessure *in vivo*. Ainsi, nous nous avons recherché dans ce modèle si la Cx30 contribuait au phénotype de réactivité astrocytaire. Pour ce faire, nous avons répété ces expériences dans des animaux déficients en Cx30, où nous avons noté que la blessure *in vivo* n'induit pas d'augmentation significative des immunomarqueurs de

réactivité (Figure 29B-C, STAT3 $-/-$ -control = 1.71 ± 0.06 a.u. vs $-/-$ wound = 2.20 ± 0.13 a.u., $p=0.62$, test de Kruskal-Wallis avec test post-hoc de Dunn, $n=29$ ROI (3 animaux) et $n=30$ ROI (3 animaux) respectivement. GFAP $-/-$ -control= 0.85 ± 0.25 a.u. vs $-/-$ -wound= 1.18 ± 0.35 a.u., $p=0.67$, test de Kruskal-Wallis avec test post-hoc de Dunn, $n=15$ ROI (3 animaux) dans les deux groupes. Iba1 $-/-$ -control= 1.20 ± 0.12 a.u. vs $-/-$ -wound= 1.61 ± 0.2 a.u., $p=0.24$, test ANOVA une voie avec test post-hoc de Tukey, $n=20$ ROI (3 animaux) et $n=19$ ROI (3 animaux) respectivement).

De plus nous avons également noté que la blessure in vivo chez les souris déficientes en Cx30, résulte en des niveaux beaucoup plus faibles d'expression de deux marqueurs de réactivité comparé aux souris sauvages (STAT3 $+/+$ wound= 8.52 ± 0.35 vs $-/-$ wound= 2.20 ± 0.13 , $***p < 0.0001$, test de Kruskal-Wallis avec test post-hoc de Dunn, $n=30$ ROI (3 animaux) dans les deux groupes. Iba1 $+/+$ wound= 2.20 ± 0.10 vs $-/-$ -wound= 1.61 ± 0.2 , $*p=0.024$, test ANOVA une voie avec test post-hoc de Tukey, $n=26$ ROI (3 animaux) et $n=19$ ROI (3 animaux) respectivement).

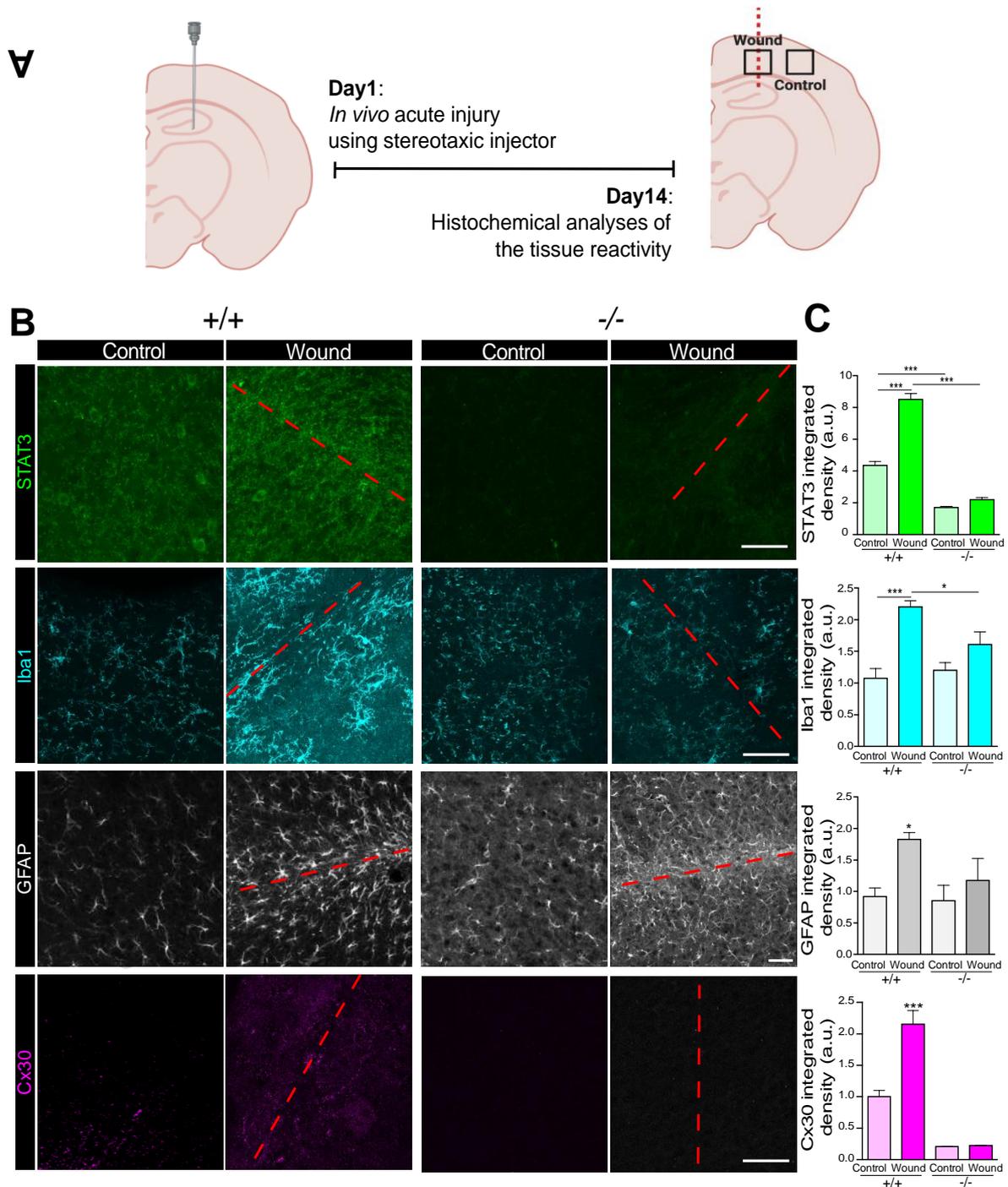


Figure 29 : La Cx30, induite dans un modèle de blessure *in vivo*, contribue à la réactivité astrocytaire A. Schéma de l'expérience de blessure *in vivo*. B. Immunomarquages de différents marqueurs de réactivité astrocytaire, et de la Cx30, au niveau de la blessure, et d'une zone contrôle hors blessure. Barre d'échelle=50 μ m. C. Quantification des marquages illustrés en B, dans des souris sauvages et déficientes en Cx30 (STAT3 : *** $p < 0.0001$, test de Kruskal-Wallis, $n = 29-40$ ROI, 3 animaux; Iba1 : *** $p < 0.0001$, test ANOVA une voie, $n = 19-26$ ROI, 3 animaux; GFAP: ** $p = 0.0052$, test de Kruskal Wallis, $n = 14-28$ ROI, 3 animaux; Cx30: *** $p < 0.0001$, test ANOVA une voie, $n = 8-20$ ROI, 3 animaux).

L'ensemble de ces résultats indique que la Cx30, augmentée en situation de réactivité lors d'une blessure aiguë *in vivo*, contribue à l'établissement de cette réactivité.

1.2. Modèle d'épilepsie du lobe temporal

Rationnel : De manière similaire aux résultats trouvés dans le modèle de la blessure in vivo, il a été observé que la Cx30 est augmentée après injection intracérébrale de kaïnate chez la souris, un modèle d'épilepsie du lobe temporal (Figure 30, Pannasch, Dossi, Ezan, & Rouach, 2019). Le kaïnate, ou acide kaïnique, est un agoniste des récepteurs au kaïnate, récepteurs ionotropiques du glutamate, et connu pour induire des crises d'épilepsie accompagnées de mort neuronale et d'activation gliale (Ravizza et al., 2005; Q. Wang, Yu, Simonyi, Sun, & Sun, 2005). Ainsi, nous avons voulu tester si cette réactivité associée à ce modèle d'épilepsie du lobe temporal était aussi altérée dans les souris dépourvues de Cx30, comme nous l'avons observé dans le modèle de blessure in vivo.

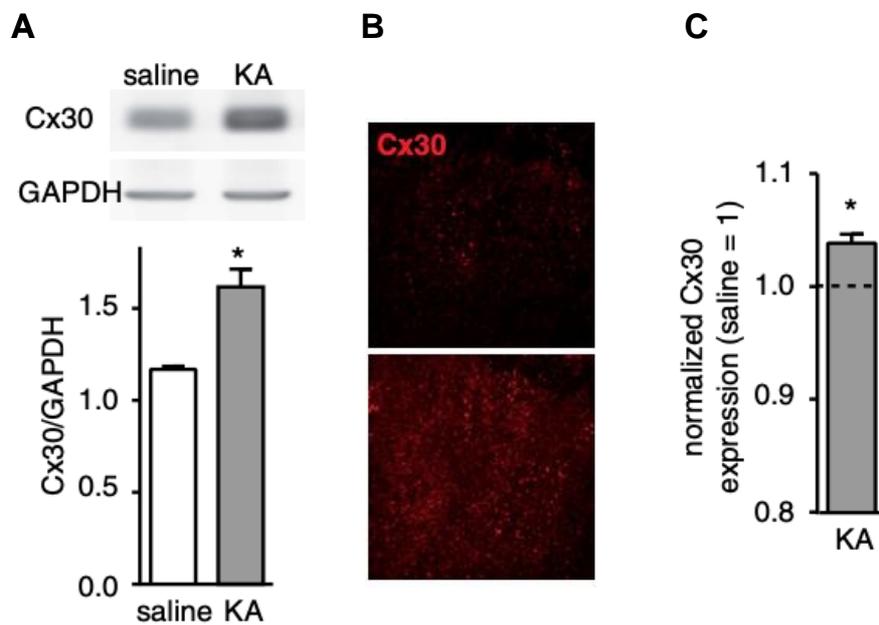


Figure 30 : La Cx30 est augmentée dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal. A. Western Blot et quantification des niveaux de Cx30 dans le lobe temporal de souris injectées avec du kaïnate ou une solution saline ($p < 0.05$, $n = 4$). B. Immunomarquages de la Cx30 après injection de solution saline (haut) ou de kaïnate (bas). C. Quantification des niveaux de Cx30 des souris injectées avec du kaïnate, normalisées par ceux des souris injectées à la solution saline, à partir d'immunomarquages comme illustrés en B ($p < 0.05$). *Modifié de Pannasch et al., 2019.*

Résultats : Nous avons trouvé qu'après injection intracérébrale de kaïnate, deux marqueurs de réactivité astrogliale, la GFAP et IBA1, étaient diminués dans les souris dépourvues de Cx30 comparés aux souris sauvages (Figure 31, GFAP $+/+ = 4.16 \pm 0.12$ a.u. vs GFAP $-/- = 3.17 \pm 0.14$ a.u., $***p < 0.0001$, t-test non apparié et Iba1 $+/+ = 1.92 \pm 0.05$ a.u. vs Iba1 $-/- = 1.70 \pm 0.03$ a.u., $***p = 0.0003$, t-test non apparié).

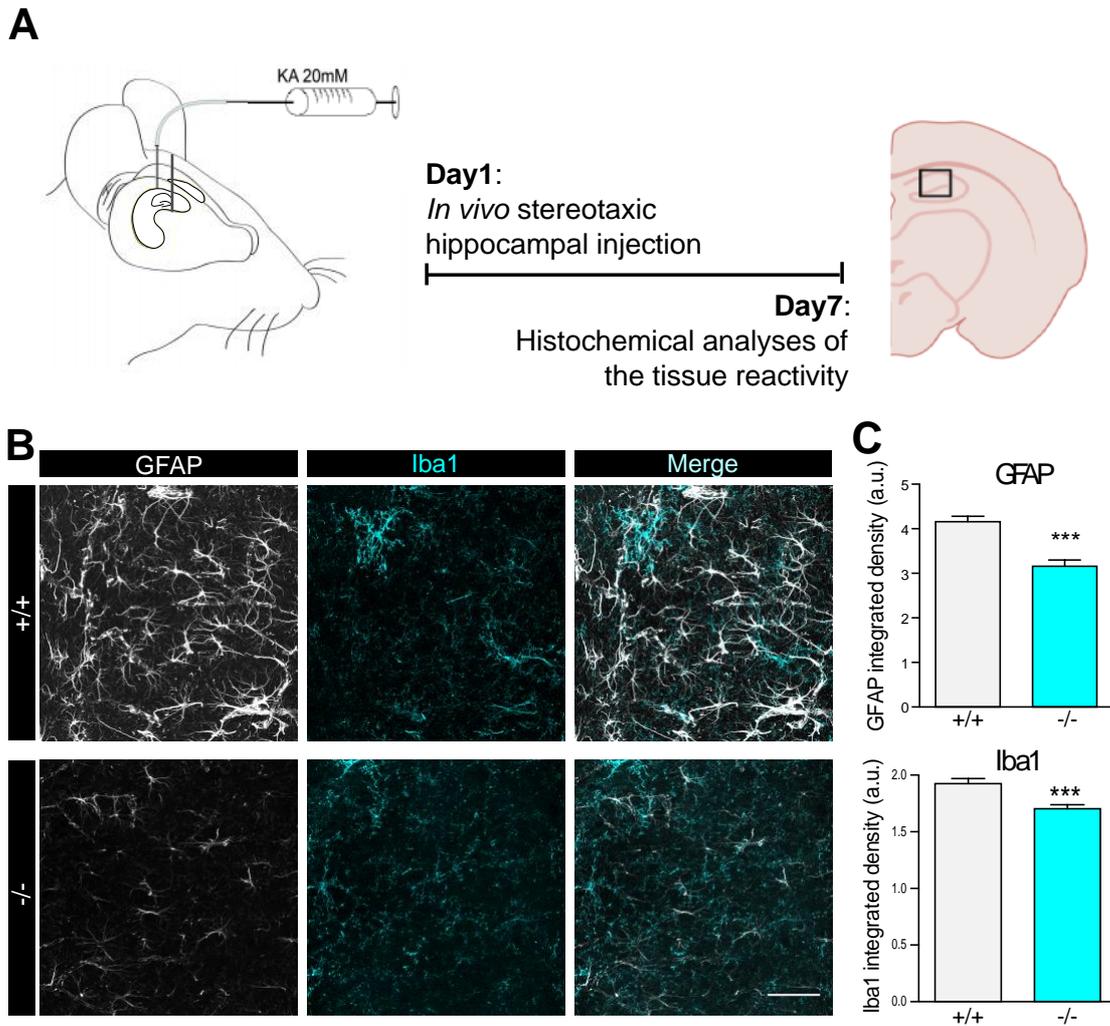


Figure 31 : Une déficience en Cx30 inhibe la réactivité astrocytaire dans un modèle murin d'épilepsie du lobe temporal. A. Schéma de l'expérience d'injection de kainate *in vivo*. B. Immunomarquages de GFAP et Iba1 de l'hémisphère injecté des souris Cx30+/+ et Cx30-/- . C. Quantification des immunomarquages illustrés en B (GFAP : *** $p < 0.0001$, t-test non apparié, $n = 42$ ROI, 3 animaux; Iba1 : *** $p = 0.0003$, t-test non apparié, $n = 42$ ROI, 3 animaux).

Nous pouvons donc conclure que la Cx30 est nécessaire à la mise en place de la réactivité astrogliale dans un modèle murin d'épilepsie du lobe temporal.

2. L'ACTIVATION SPECIFIQUE DE LA VOIE JAK/STAT AUGMENTE L'EXPRESSION DE LA Cx30

Rationnel : Après avoir observé une augmentation de Cx30 sur des modèles de pathologie associés à de la réactivité astrocytaire, nous avons investigué si l'activation directe d'une voie de signalisation impliquée dans la réactivité astrocytaire était suffisante à induire une augmentation de Cx30. Cette expérience a pour but de déterminer si les changements de niveaux de Cx30 sont induits par des paramètres pathologiques multiples,

ou par l'activation spécifique d'une voie de transduction impliquée dans la réactivité astrocytaire, la voie de JAK/STAT (cf. Introduction II.3). Ainsi, à l'aide de deux vecteurs viraux (collaboration avec le Dr. Carole Escartin), nous pouvons moduler spécifiquement cette voie de signalisation (Figure 32A), soit en l'activant via l'enzyme janus kinase via JAK2 (AAV-GFA1BCD-JAK2ca), soit en l'inhibant, à l'aide de la protéine suppressor of cytokine signaling protein 3 SOCS3 (AAV-GFA1BCD-SOCS3) (Ceyzériat et al., 2018).

Résultats : Nous avons observé que l'activation de la voie JAK/STAT, induit bien une réactivité astrogliale (Figure 32B-C, GFAP : AAV-GFP=2.87±0.13 a.u. vs GFAP : AAV-JAK2=3.83±0.07 a.u. ***p<0.0001, test ANOVA une voie avec test post-hoc de Tukey. Iba1 : AAV-GFP=0.68±0.04 a.u. vs Iba1 : AAV-JAK2=5.4±0.14 a.u. ***p<0.0001, test ANOVA une voie avec test post-hoc de Tukey) qui s'accompagne d'une augmentation du niveau de Cx30 (Cx30 : AAV-GFP=0.74±0.04 a.u. vs Cx30 : AAV-JAK2=0.96±0.03 a.u., ***p<0.0001, test de Mann-Whitney).

Ceci indique que l'activation spécifique de la voie JAK/STAT est suffisante pour augmenter les niveaux de Cx30.

Notons cependant que l'inhibition sélective de la voie JAK/STAT par SOCS3, en condition basale (de non réactivité), s'accompagne d'une réduction des niveaux de GFAP (Figure 32B-C, AAV-GFP=2.87±0.13 a.u. vs AAV-SOCS3=1.92±0.08 a.u., ***p<0.0001, ANOVA une voie avec un test post-hoc de Tukey), mais non d'Iba 1 (AAV-GFP=0.68±0.04 a.u. vs AAV-SOCS3=0.87±0.03 a.u. ns avec une ANOVA une voie avec un test post-hoc de Tukey), et n'induit pas de baisse d'expression de la Cx30 (AAV-GFP=0.74±0.04 a.u. vs AAV-SOCS3=0.80±0.04 a.u., ns p=0.548 avec un test de Mann-Whitney).

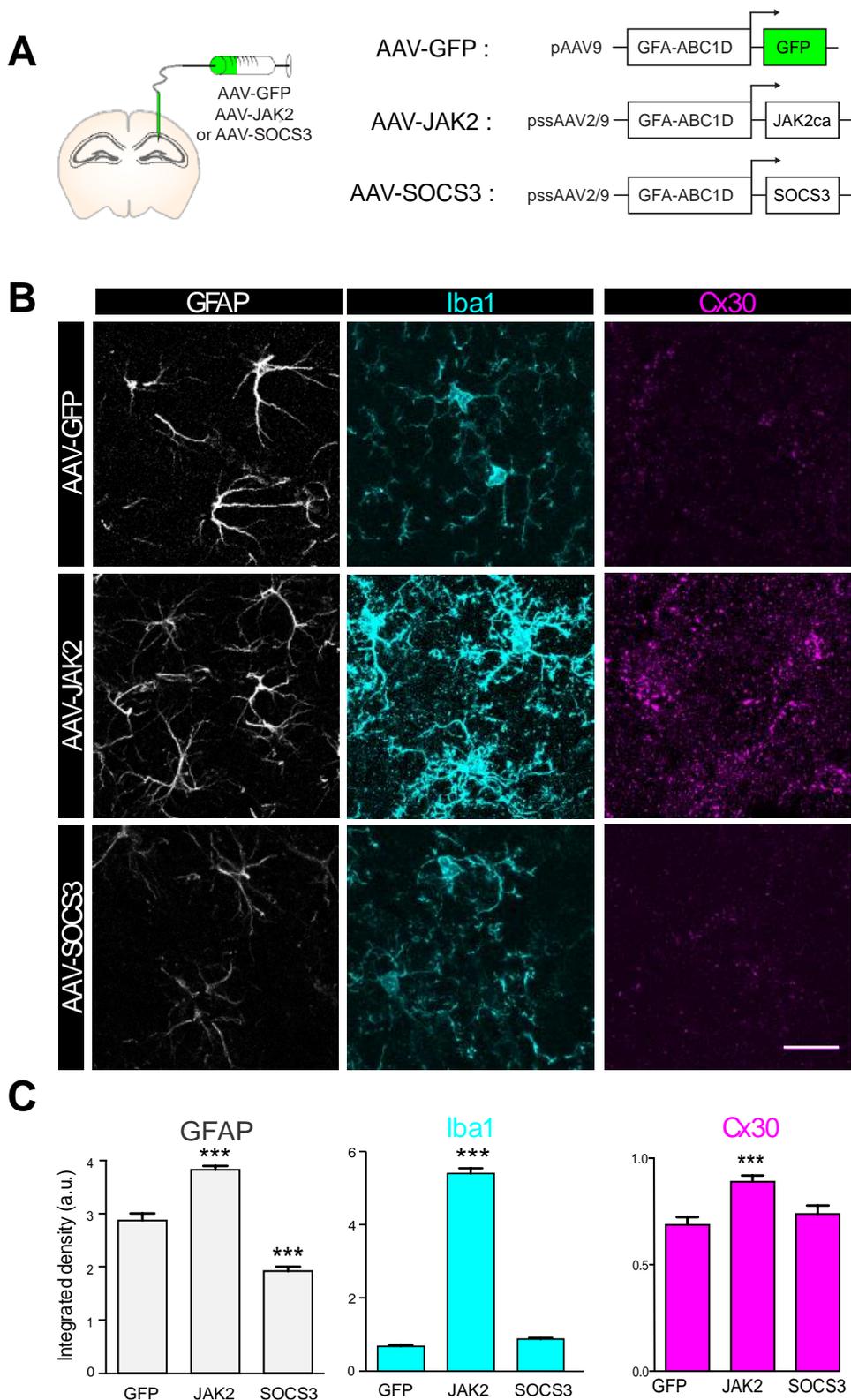


Figure 32 : L'activation directe de la voie JAK/STAT sous-tendant la réactivité astrocytaire augmente l'expression de la Cx30. A. Schéma de l'expérience et des 3 vecteurs viraux utilisés. B. Immunomarquages de GFAP, Iba1 et Cx30 dans les hémisphères injectés. Echelle=20 μ m. C. Quantification des immunomarquages illustrés en B (tests ANOVA une voie, GFAP : n(GFP)=38 ROI (3 animaux), n(JAK2)=25 ROI (3 animaux), n(SOCS3)=60 ROI (3 animaux), Iba1 : n(GFP)=32 ROI (3 animaux), n(JAK2)=25 ROI (3

animaux), n(SOCS3)=36 ROI (3 animaux), Cx30 : n(GFP)=75 ROI (3 animaux), n(JAK2)=23 ROI (3 animaux), n(SOCS3)=68 ROI (3 animaux)).

Ainsi, nous concluons que l'induction d'une réactivité astrogliale sous-tendue par la voie JAK/STAT augmente l'expression de la Cx30. Nous avons donc recherché si l'augmentation de l'expression de la Cx30 régulait en retour la réactivité astrocytaire sous-tendue par la voie JAK/STAT.

3. LA SUREXPRESSON DE LA Cx30 INDUIT UNE REACTIVITE ASTROGLIALE

Rationnel : Nous avons observé que, d'une part, la Cx30 est augmentée dans différentes conditions pathologiques associées à la réactivité astrocytaire et que l'activation directe et spécifique d'une voie de signalisation impliquée dans la réactivité astrocytaire (JAK/STAT) est suffisante pour induire l'augmentation d'expression de la Cx30. De plus, nous avons observé une diminution de cette réactivité astrocytaire en l'absence de Cx30. Ainsi, nous nous sommes posées la question de savoir si l'augmentation de la Cx30 était une conséquence ou une cause de la réactivité et si l'augmentation de Cx30 était une condition suffisante à l'induction d'une réactivité astrocytaire. Pour ce faire, nous avons utilisé un vecteur viral permettant de surexprimer la Cx30 (AAV-GFABGLOB-GFP-Cx30) (collaboration avec le Dr. Alexis Bemelmans (Figure 33A)).

Résultats : Nous avons utilisé un vecteur viral ciblant sélectivement les astrocytes de façon à induire une surexpression de la Cx30 de 50% (Figure 33A-B, AAV-GFP=1.00±0.04 a.u vs AAV-GFP-Cx30=1,5±0.07, t-test non apparié, n=14 ROI (3 animaux) et n=18 ROI (3 animaux) respectivement). De manière intéressante, cette augmentation de Cx30 s'accompagne d'une augmentation d'expression des marqueurs de réactivité GFAP et IBA1, comparé à l'injection du virus contrôle GFP (Figure 33C, GFAP : AAV-GFP=1.0±0.07 a.u. vs GFAP : AAV-Cx30=1.37±0.10 a.u., *p=0.0411 avec un test de Mann-Whitney. Iba1 : AAV-GFP=1.0±0.06 a.u. vs Iba1 AAV-Cx30=1.68±0.17 a.u., *p=0.0152 avec un test de Mann-Whitney, n=6 ROI (3animaux) pour les quatre groupes).

La réactivité astrocytaire induit également des modifications morphologiques caractéristiques consistant notamment en une augmentation de la taille du soma et une rétraction des prolongements (Escartin et al., 2019). Nous avons donc également investigué ici la morphologie des astrocytes surexprimant la Cx30. Une analyse de Sholl de ces astrocytes a révélé que l'arborisation de leurs prolongements est diminuée par rapport aux astrocytes contrôles, avec notamment plus de prolongements proximaux et moins de prolongements distaux (AAV-GFP vs AVV-GFP-Cx30, ***p>0.0001, ANOVA deux voies à mesures répétées, n=9 cellules (3 animaux) et n=10 cellules (3 animaux) respectivement) (Figure 33D, panels hauts). Par ailleurs, ces astrocytes présentent également une forte augmentation de la taille du corps cellulaire (AAV-GFP=79.31±5.5µm² vs AVV-GFP-Cx30= 124.4±6.4 µm², ***p<0.0001, t-test non apparié, n=10 cellules (3 animaux) dans les deux groupes) (Figure 33D, panels bas) ainsi qu'une diminution de l'aire de leur domaine (AAV-GFP=2315±117.7µm² vs AVV-GFP-Cx30= 1843±160.1 µm², *p=0.029, t-test non apparié, n=10 cellules (3 animaux) dans les deux groupes). Ces caractéristiques morphologiques des astrocytes surexprimant la Cx30 correspondent à celles d'astrocytes réactifs.

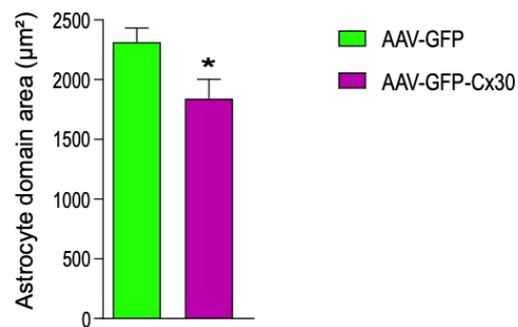
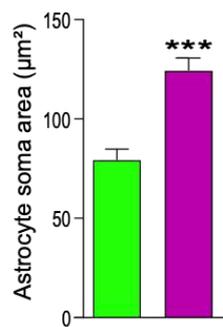
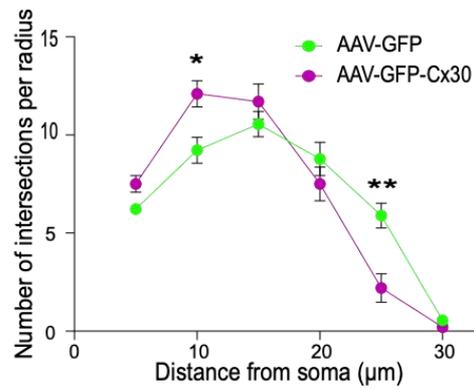
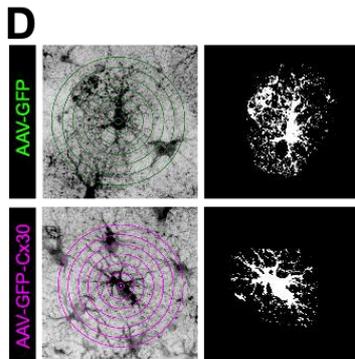
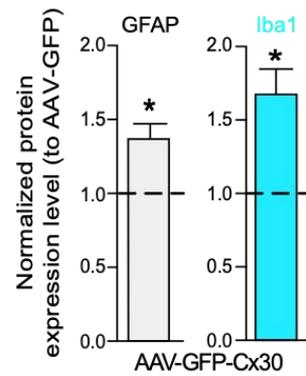
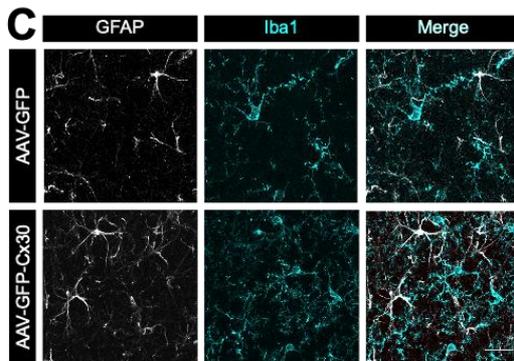
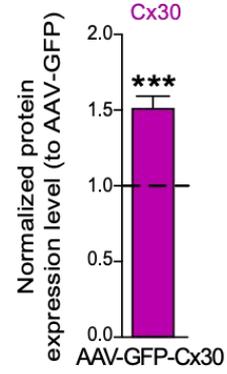
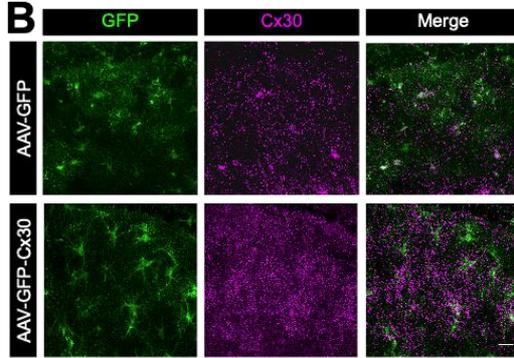
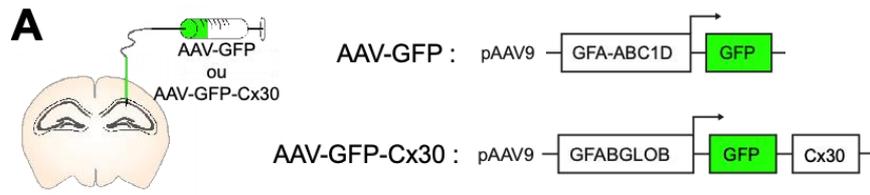


Figure 33 : La surexpression de Cx30 induit une réactivité astrocytaire. A. Schéma de l'expérience et des vecteurs viraux utilisés. B. Illustration de la surexpression de Cx30 dans la zone d'injection (positive à la GFP) via des immunomarquages et quantification de l'expression de la Cx30 après injection de l'AAV-GFP-Cx30 (n=18 ROI (3animaux)), normalisée par la fluorescence de la Cx30 mesurée après injection de l'AAV-GFP contrôle (n=14 ROI (3 animaux)). C. Immunomarquages de protéines cibles de la réactivité (GFAP et Iba1) après surexpression de Cx30, normalisé par l'expression mesurée après injection de l'AAV-GFP (GFAP : *p=0.0411 avec un test de Mann-Whitney. Iba1 : *p=0.0152 avec un test de Mann-Whitney, n=6 ROI (3animaux) pour les quatre groupes). Barres d'échelle=20 µm. D. Changements morphologiques induits par la surexpression de la Cx30, avec analyse de Sholl sur les astrocytes contrôles et surexprimant la Cx30 (panels haut gauche et haut droite, ***p>0.0001, ANOVA deux voies à mesures répétées, n(AAV-GFP)=9 cellules (3 animaux) et n(AAV-GFP-Cx30)=10 cellules (3 animaux), de la taille des corps cellulaires (panel bas gauche, ***p<0.0001, t-test non apparié, n=10 cellules (3 animaux) dans les deux groupes) et de l'aire du domaine astrocytaire (, *p=0.029, t-test non apparié, n=10 cellules (3 animaux) dans les deux groupes).

L'ensemble de ces résultats indique que l'augmentation de la Cx30 est suffisante pour induire de la réactivité astrogliale.

En somme, nous observons d'une part que la Cx30 est surexprimée dans différentes conditions pathologiques caractérisées par une réactivité astrogliale (cocaïne, blessure in vivo, souris kaïnate), mais aussi lors de l'activation directe et spécifique d'une voie de transduction, la voie JAK/STAT, impliquée dans la réactivité; d'autre part, l'augmentation de Cx30 est suffisante pour induire un profil d'astrocyte réactif; et enfin la déficience en Cx30 inhibe la réactivité astrogliale.

Ainsi, nous pouvons conclure que **la Cx30 est un acteur majeur de la réactivité astrogliale.**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PARTIE I : Calcium et morphologie

1. LE CALCIUM INTRACELLULAIRE REGULE LA MORPHOLOGIE DES ASTROCYTES

Nous avons montré dans ce projet que la morphologie des astrocytes est dépendante du calcium intracellulaire. Cette découverte pourrait permettre de réinterpréter de nombreuses études utilisant les techniques d'inhibition calcique mentionnées dans le projet (chélation ou approche génétique) afin en théorie d'altérer la libération de gliotransmetteurs, considérée comme calcium-dépendante (Agulhon et al., 2012). En effet, en inhibant la signalisation calcique intracellulaire dans les astrocytes de façon similaire aux approches classiquement utilisées dans la littérature, nous montrons ici que cela modifie non seulement la morphologie des astrocytes mais aussi leur couverture des synapses (cf. Résultats partie I, figures 2-3). Or l'efficacité de la gliotransmission est déterminée en partie par la proximité de l'astrocyte à la synapse, qui influence la disponibilité en gliotransmetteurs, ce qui a des conséquences directes sur la transmission synaptique et extrasynaptique (Oliet et al., 2001; Omrani et al., 2009; Pannasch et al., 2014; Parpura & Zorec, 2010). Au sein du laboratoire, il a d'ailleurs été montré que la modulation seule de la morphologie des astrocytes résultant en une modification de la couverture des synapses peut altérer la neurotransmission glutamatergique, et notamment la capacité à mettre en place une plasticité sur le long terme (Pannasch et al., 2014).

Ainsi, les modifications de concentrations calciques astrocytaires étant couplées à des changements de morphologie, notamment de couverture synaptique, il serait judicieux de prendre en compte ce facteur dans de futures études portant sur le sujet.

Il serait notamment intéressant de démontrer expérimentalement que les changements de morphologie astrocytaire induits par diminution des niveaux de calcium intracellulaires ont une influence directe sur la neurotransmission. Pour cela, il faudrait pouvoir discriminer les effets observés dus aux seuls changements de morphologie de ceux induits par une inhibition de la libération calcium-dépendante de gliotransmetteurs. Pour ce faire, nous proposons dans une première étape de mesurer les changements de transmission synaptique observée en patch clamp après avoir inhibé l'activité calcique astrocytaire, et de comparer nos résultats entre les différents modèles étudiés ici, afin de déterminer si une corrélation entre les modifications morphologiques induites par la technique et les changements d'activité neuronale est observable.

2. COMMENT LE CALCIUM INFLUE SUR LA MORPHOLOGIE ASTROCYTAIRE ?

Maintenant que nous avons établi un lien direct entre concentration calcique intracellulaire et morphologie des astrocytes, il est intéressant de s'interroger sur la cause de ce lien

De façon intéressante, de récents travaux ont montré un lien direct entre une réorganisation du cytosquelette astrocytaire et l'activité calcique (Heimfarth et al., 2016, 2017). En effet, ces travaux démontrent que la neurotoxine Diphenylditelluride, connue

pour son action de perturbation du cytosquelette, agit via des mécanismes dépendants du calcium intracellulaire (Heimfarth et al., 2016, 2017). Par ailleurs, il a été montré que les signalisations glutamatergique et purinergique pouvaient être responsables des modifications morphologiques via les augmentations de niveaux de calcium intracellulaire (Grimaldi et al., 1999; Pierozan et al., 2014; Singh et al., 2015). De fait, l'activité neuronale à proximité de l'astrocyte induit une augmentation calcique qui, à son tour, induit un changement de morphologie des prolongements astrocytaires. Ainsi, une première hypothèse expliquant pourquoi modifier la concentration de calcium intracellulaire influencerait sur la morphologie de l'astrocyte serait donc le lien direct entre la concentration calcique et la réorganisation du cytosquelette.

Une autre hypothèse sur l'influence du calcium intracellulaire sur la morphologie astrocytaire est plus indirecte. En effet, les astrocytes sont des acteurs majeurs d'une signalisation active appelée gliotransmission, qui est notamment dépendante de l'activité calcique astrocytaire (Aguilhon et al., 2012; Scemes & Giaume, 2006). Les effets de cette gliotransmission sont dépendants de la proximité des PAP à la synapse, car la sécrétion des gliotransmetteurs est plus efficace à proximité de la synapse, tout comme la capture des neurotransmetteurs. Or, ces signalisations entre astrocytes et neurones augmentent aussi l'activité calcique des astrocytes, créant ainsi une boucle de rétroaction positive entre calcium astrocytaire et (glio-)transmission synaptique. Il a été montré que les changements d'activité neuronale et de concentrations synaptiques en neurotransmetteurs influent sur la morphologie astrocytaire (Wenzel et al., 1991). En effet, Wenzel *et al.* Montrent qu'après l'induction d'une LTP, de significatifs changements morphologiques sont observés, notamment le rapprochement des prolongements astrocytaires de la fente synaptique Or, en empêchant la plasticité calcique astrocytaire, la transmission astrocytes-neurones est altérée et la morphologie astrocytaire ne peut s'adapter à son environnement de manière physiologique.

3. PERSPECTIVES

Etant donné que nous avons établi un lien entre concentration calcique et morphologie astrocytaire, il serait judicieux d'étudier les modifications de Ca^{2+} astrocytaire dans des situations physiologiques connues pour induire de grands changements morphologiques astrocytaires. Notamment, le retrait des prolongements astrocytaires de la synapse est observé en conditions de lactation (Oliet et al., 2001), lors du sommeil (Bellesi, de Vivo, Tononi, & Cirelli, 2015) ou encore lors d'un apprentissage pavlovien de la peur (Ostroff, Manzur, Cain, & Ledoux, 2014). Ainsi, il serait intéressant d'étudier ces modèles en conditions où le calcium intracellulaire est très faible, comme par exemple en utilisant les souris $IP_3R2^{-/-}$. Est-ce que le calcium intracellulaire est responsable au moins en partie de ces changements morphologiques ? Quelles fluctuations de calcium intracellulaire existent lors de ces processus physiologiques de changements morphologiques ?

En conclusion, nous avons mis en évidence le fait que modifier les concentrations de calcium des astrocytes altère leur morphologie. Ainsi, ce projet avait pour but de permettre à chacun de prendre du recul sur les techniques utilisées pour étudier le calcium

astrocytaire, et a permis de faire le lien entre la couverture synaptique astrocytaire et les concentrations de calcium intracellulaire. Il serait intéressant à présent de comprendre par quels mécanismes le calcium agit sur la morphologie astrocytaire.

PARTIE II : Cocaïne et Cx30

1. LES MODIFICATIONS ASTROCYTAIRES INDUITES PAR LA COCAÏNE DANS LE NAC

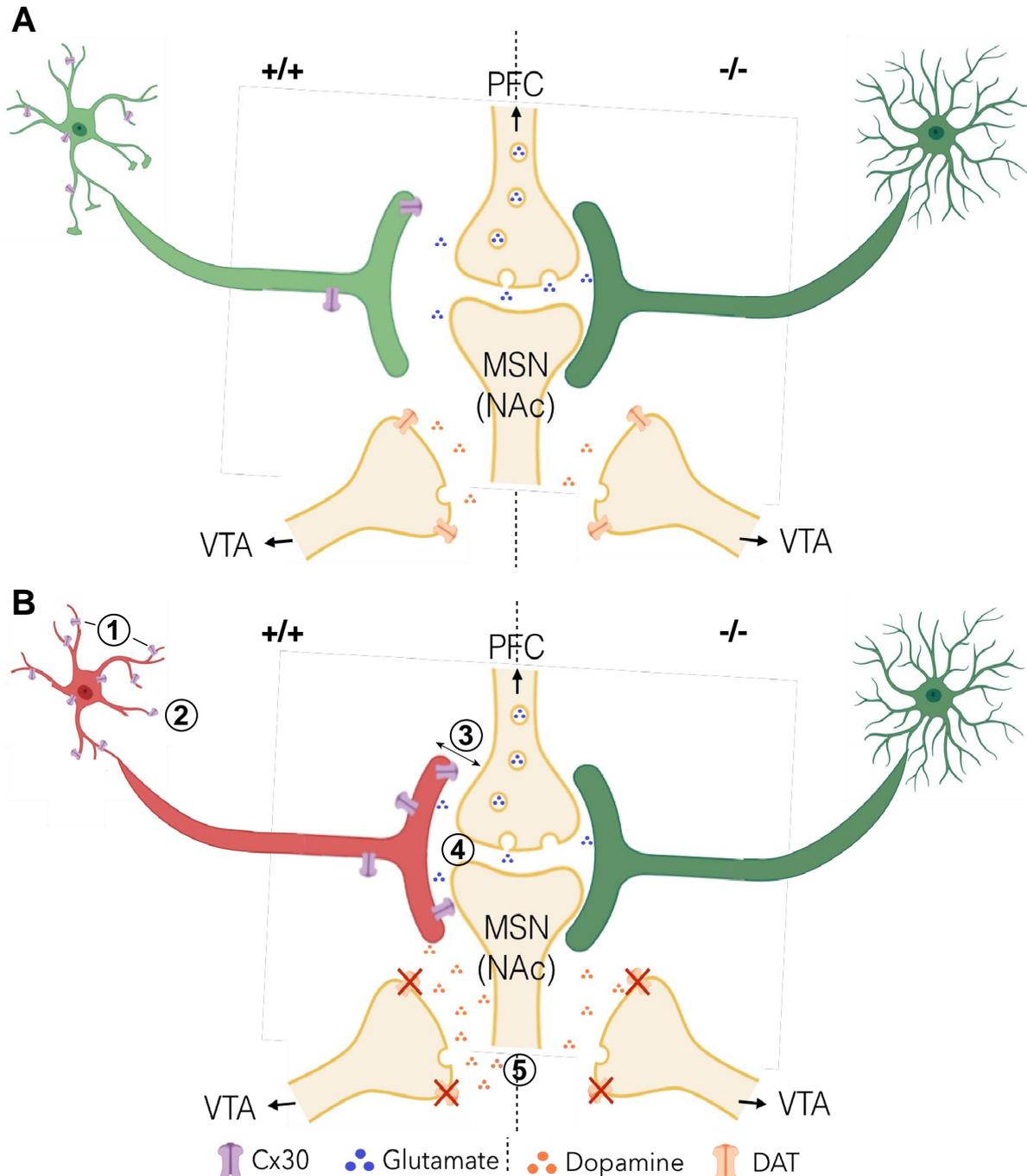


Figure 34 : Schéma récapitulatif des modifications induites par la cocaïne observées dans le NAc. A. Résultats observés dans le NAc en conditions natives (saline) dans les souris sauvages (+/+, gauche) et déficientes en Cx30 (-/-, droite). En l'absence de Cx30, les astrocytes accumbaux ont une morphologie plus complexe, et sont plus proches de la synapse glutamatergique PFC-NAc. Les niveaux endogènes de dopamine sont plus faibles

que celui observé dans les souris sauvages. B. Après injections de cocaïne, plusieurs modifications ont été observées. 1 : Une augmentation des niveaux endogènes de Cx30 (souris sauvages uniquement). 2 : Une réduction de l'arborisation astrocytaire accompagnée de la mise en place d'une réactivité astrocytaire (souris sauvages uniquement). 3 : Une diminution de la distance entre l'astrocyte et la synapse glutamatergique (souris sauvages uniquement). 4 : Diminution des niveaux de glutamate synaptique (souris sauvages uniquement). 5 : Augmentation des niveaux de dopamine due au blocage des transporteurs à la dopamine DAT (souris sauvages et déficientes en Cx30).

1.1. Les changements d'expression endogène de la Cx30 dans le NAc

Nous avons observé une augmentation des niveaux d'expression de la Cx30 dans le NAc à la suite d'un protocole de sensibilisation à la cocaïne (Figures 15 et 34). De plus, nous avons montré que ces changements d'expression n'étaient pas dus à une régulation transcriptionnelle de la Cx30 (Figure 16). Par ailleurs, nous avons montré que l'augmentation de la Cx30 induite par la cocaïne est dépendante du calcium astrocytaire (Figure 17). De nombreux travaux ont montré que la signalisation calcique astrocytaire est dépendante de l'activité neuronale (Scemes & Giaume, 2006). Nos résultats suggèrent donc que la régulation de l'expression de la Cx30 par la cocaïne est activité-dépendante. Cette hypothèse est en accord avec un travail récent du laboratoire (Ghézali et al., 2019). En effet, cette étude montre, dans l'hippocampe, que l'activité neuronale augmente les niveaux de la Cx30, et ce via l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) astrocytaires par un mécanisme d'inhibition de la voie de dégradation lysosomale. Il serait intéressant d'étudier si un mécanisme similaire est en jeu dans le cas de l'augmentation de la Cx30 induite par la cocaïne dans le NAc.

Une autre hypothèse relative à cette augmentation des niveaux de Cx30 après administration de cocaïne pourrait être liée à la mise en place d'une réactivité astrocytaire. En effet, nous avons observé que 1) les astrocytes deviennent réactifs après injection de cocaïne (Figure 22), et 2) que plus généralement la réactivité astrocytaire associée à diverses conditions pathologiques s'accompagne dans plusieurs modèles d'une augmentation des niveaux de Cx30 (Figures 29 à 32). Il est donc envisageable que la mise en place d'une réactivité astrocytaire en réponse aux injections de cocaïne sous-tende l'augmentation de la Cx30.

1.2. La cocaïne régule l'arborisation astrocytaire de façon Cx30-dépendante

Après sensibilisation à la cocaïne, nous avons observé une réduction de la complexité de l'arborisation astrocytaire dans le NAc des souris sauvages (Figures 19 et 34). Cependant, cette différence est absente chez les souris déficientes en Cx30, qui présentent déjà une arborisation des astrocytes significativement plus grande en condition basale (solution saline). Ainsi, nous avons conclu que dans le NAc, la complexité de la morphologie astrogliale est dépendante des niveaux d'expression de la Cx30. Il a été montré que la Cx30 interagissait avec des protéines du cytosquelette (D. Hua He, Feng, Mei, & He, 2009; Qu, Gardner, & Schrijver, 2009), ce qui pourrait être un moyen par lequel la Cx30 influe sur la morphologie astrocytaire. Par ailleurs, il a aussi été montré récemment au laboratoire que la Cx30, via son interaction avec la laminine et la β_1 -intégrine, contrôlait la polarisation

astrocytaire lors du développement cérébral postnatal (Ghézali et al., 2018), prouvant que la Cx30 a une influence directe sur des protéines modulatrices de la morphologie astrocytaire.

De plus, ce résultat concorde avec l'étude menée au laboratoire dans l'hippocampe, où l'absence de Cx30 induit une augmentation de la ramification des prolongements astrocytaires (Pannasch et al., 2014). Ainsi, ce schéma observé dans l'hippocampe semble être similaire dans le NAc, et l'absence de Cx30 augmente la complexité de l'arborescence astrogliale. Inversement, la cocaïne qui induit une augmentation de Cx30, diminue la ramification des prolongements des astrocytes accumbaux des souris sauvages.

De façon intéressante, nos derniers résultats indiquent que ces changements de morphologie des astrocytes induits par la cocaïne résultent aussi en une modification de la couverture astrogliale des synapses. Une étude en imagerie super-résolutive STED (D. Mazaud au laboratoire) indique en effet que la cocaïne induit un rapprochement des prolongements astrocytaires des synapses chez les souris sauvages, alors que cet effet n'est pas observé dans les souris déficientes en Cx30 (Figure 21). Cependant, dans ces souris qui n'expriment pas la Cx30, les prolongements astrocytaires sont déjà proches des synapses et à une distance similaire à celle observée dans les souris sauvages traitées par la cocaïne (Figure 21), ce qui suggère une occlusion. Cet effet de rapprochement des astrocytes aux synapses par la cocaïne est en premier abord surprenant car ils sont moins ramifiés et réactifs par rapport aux astrocytes contrôles. Il est cependant possible que la distribution homogène et dense des synapses cumulée à un épaissement des prolongements astrocytaires dû à leur réactivité résulte de façon probable à une plus grande couverture astrogliale des synapses dans la partie proximale et médiane de l'arborescence astrogliale. Il faut donc à présent évaluer cette couverture de façon plus globale et particulièrement au niveau distal. Pour ce faire des expériences d'imagerie confocale, super-résolutive STED et de microscopie électronique sont en cours. Ces dernières permettront d'évaluer également la présence ou non d'invasion des synapses par les prolongements astrocytaires, comme observé dans l'hippocampe de souris déficientes en Cx30 (Pannasch et al., 2014).

1.3. Induction d'une réactivité astrocytaire par la cocaïne

Nous avons observé que la cocaïne induit une réactivité des astrocytes dans le NAc (Figures 22 et 34). Ce résultat est en accord avec plusieurs études qui ont rapporté l'induction d'un profil réactif/inflammatoire à la suite d'exposition à différentes drogues, telles que l'alcool et les opioïdes (Erickson, Blednov, Harris, & Mayfield, 2019; O'Sullivan et al., 2019). A l'inverse, une étude a aussi montré que la mise en place d'une neuroinflammation renforçait l'effet de la cocaïne (Merkel, Razmpour, et al., 2017).

De façon intéressante il a été montré dans le NAc, qu'après administration de cocaïne, plusieurs marqueurs d'une inflammation sont augmentés, comme la High mobility group box 1 (HMGB1), une molécule inflammatoire exprimée par les neurones et cellules immunitaires (S. Q. Gao et al., 2019), et le TNF- α (Lewitus et al., 2016). Ce dernier en particulier, est connu comme étant un inducteur d'une réactivité astrocytaire (Liddelow & Barres, 2017), et pourrait donc être à l'origine de l'induction d'une réactivité astrogliale induite par la cocaïne.

Il a aussi été montré qu'à la suite d'une exposition à la cocaïne, il y a une augmentation des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène dans les neurones du NAc, ce qui a pour conséquence de renforcer le comportement induit par la cocaïne (Jang et al., 2015). Or nous savons que dans les astrocytes, la signalisation des espèces réactives de l'oxygène s'accompagne d'une induction de réactivité astrocytaire (Alfonso-Loeches et al., 2014).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que ces signalisations pro-inflammatoires induites par la cocaïne ont une influence directe sur la transmission glutamatergique. En effet, la signalisation TNF- α dans le NAc induit des changements directs sur la conformation du récepteur AMPA (Ganguly, Honeycutt, Rowe, Demaestri, & Brenhouse, 2019), ce qui a des conséquences sur la mise en place d'une plasticité glutamatergique.

Il est intéressant de noter que la transmission dopaminergique peut aussi être un déclencheur d'une réactivité astrocytaire. En effet, il a été montré que l'augmentation de dopamine induit une sécrétion de TNF- α par les astrocytes, ce qui a pour conséquence d'induire une mort neuronale (S. Ding et al., 2016).

Toutefois il a aussi été montré qu'une diminution de la transmission dopaminergique pouvait s'accompagner de réactivité astrocytaire. En effet, l'activation des récepteurs à la dopamine D2 induit une suppression de la neuroinflammation dans la substance noire (Shao et al., 2013). De plus, dans les stades précoces de la maladie de Parkinson, une diminution des niveaux de dopamine s'accompagne d'une augmentation de la réactivité astrocytaire (Dominguez-Meijide, Rodriguez-Perez, Diaz-Ruiz, Guerra, & Labandeira-Garcia, 2017).

Ainsi, la mise en place d'une réactivité astrogliale pourrait influencer différents aspects des mécanismes de l'addiction à la cocaïne, la neurotransmission, et même le comportement (Sofroniew, 2014).

Notons cependant que nous n'observons pas de réactivité astrogliale induite par la cocaïne dans les souris déficientes en Cx30. Un deuxième projet a donc été dédié à la question du lien entre la réactivité astrogliale et la Cx30, et est discuté en partie III.

2. MODIFICATIONS DES TRANSMISSIONS GLUTAMATERGIQUE ET DOPAMINERGIQUE DANS LE NAC

2.1. Changements de la transmission glutamatergique dans le NAc en l'absence de Cx30

Nous avons identifié qu'en l'absence de Cx30, il n'y a pas d'augmentation de transmission glutamatergique dans le NAc induite par la cocaïne. La Cx30 serait donc un frein à la mise en place d'une plasticité glutamatergique. Cet effet a d'ailleurs déjà été observé dans l'hippocampe (Pannasch et al., 2014). Il serait intéressant d'explorer un peu plus cette hypothèse, et la possibilité que la diminution de la Cx30 dans le NAc serait une cible thérapeutique potentielle, empêchant la mise en place d'une plasticité glutamatergique induite par la cocaïne, qui est le point de départ d'un comportement de rechute (Cornish & Kalivas, 2000). Des peptides spécifiques existent pour bloquer les connexines (Howard Evans & Leybaert, 2007). Malheureusement, leur action bloque spécifiquement les fonctions hémicanal et canal des connexines. Or les modifications morphologiques des astrocytes induites par l'absence de Cx30 ont été attribuées aux fonctions indépendantes du canal (Ghézali et al., 2018). Il serait cependant possible de

déterminer si la partie C-terminale de la Cx30, qui a été montrée comme étant responsable de cette fonction canal indépendante (Pannasch et al., 2014), est impliquée dans la régulation des effets de la cocaïne.

Un des liens possibles entre la régulation de la transmission glutamatergique par la cocaïne et la Cx30 pourrait être le transporteur astrocytaire au glutamate GLT-1. En effet, l'administration de cocaïne induit une augmentation de l'expression de ces transporteurs dans le NAc (Shimamoto et al., 2018). De plus il a déjà été montré au laboratoire dans l'hippocampe que la Cx30 astrogliale régule fonctionnellement le transport au glutamate sous-tendu par GLT-1 (Pannasch et al., 2014). Cependant dans cette étude, cet effet n'est pas dû à un changement d'expression des GLT-1, mais à une régulation de leur proximité à la synapse via les changements de morphologie astrocytaire. L'ensemble de ces données suggèrent que la cocaïne, en régulant l'expression de la Cx30 qui contrôle la proximité des astrocytes aux synapses, et possiblement également en régulant directement l'expression des GLT-1, pourrait moduler le transport astrocytaire de glutamate et donc la transmission glutamatergique. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions dans un premier temps mesurer les niveaux de GLT-1 dans les souris sauvages et déficientes en Cx30 traitées ou non à la cocaïne. Nous pourrions ensuite mesurer fonctionnellement le transport au glutamate induit par stimulation synaptique. Enfin, nous aimerions partiellement inhiber pharmacologiquement les transporteurs GLT-1 et déterminer l'impact de cette manipulations sur la transmission synaptique glutamatergique dans les souris sauvages et déficientes en Cx30 traitées ou non par la cocaïne.

Un autre lien entre la transmission glutamatergique induite par la cocaïne dans le NAc et les connexines qu'il serait intéressant d'étudier est celui du rôle des canaux hydriques astrocytaires de type 4 (aquaporine 4, AQP4). En effet, il a été montré que l'AQP4 est enrichie notamment au niveau des points de contact des PAPs aux synapses glutamatergiques (Nielsen et al., 1997) et contrôle les modifications du volume extracellulaire induites par l'activité neuronale. Cette dernière engendre une réduction de l'espace extracellulaire, sous-tendue par les canaux AQP4 (Dietzel, Heinemann, Hofmeier, & Lux, 1980; Haj-Yasein et al., 2012). Ce phénomène est dû à une augmentation du volume astrocytaire générée par l'absorption de molécules d'eau en même temps que la capture de K^+ , de Na^+ ou glutamate (MacAulay & Zeuthen, 2010; G. H. Schneider, Baethmann, & Kempinski, 1992). Ainsi, la signalisation glutamatergique influence le volume astrocytaire via l'AQP4.

De plus, il a été montré que la délétion en AQP4 s'accompagne d'une diminution de la capture glutamatergique et d'une diminution de l'expression de GLT-1 dans les astrocytes (Zeng et al., 2007). Par ailleurs, dans le contexte de l'addiction à la cocaïne, il a été observé dans les souris déficientes en AQP4 une diminution de l'activité locomotrice induite par la cocaïne, accompagnée d'une altération des niveaux de glutamate et dopamine dans le NAc (Z. Li et al., 2006). Ainsi, la transmission glutamatergique, les niveaux d'expression d'AQP4 et les changements de morphologie astrocytaire sont des phénomènes étroitement liés. Ces résultats étant similaires à ceux observés dans l'étude présentée ici, nous pouvons nous interroger sur le lien entre l'AQP4 et les connexines astrocytaires.

Ainsi, il a aussi été montré que la déficience en AQP4 induisait une augmentation des niveaux de connexines dans les astrocytes (Katozi et al., 2017). Il semblerait donc que les

Cxs et l'AQP₄ ont une fonction similaire dans la régulation du volume astrocytaire, et agissent de manière compensatoire. Dans certaines pathologies, la diminution d'expression en AQP₄ s'accompagne d'une réduction des niveaux de connexines (Masaki, 2015; Masaki et al., 2012), ce qui montre bien le lien étroit entre ces canaux astrocytaires. Ce lien a notamment été montré en conditions physiologiques entre l'AQP₄ et les Cx43 (Nicchia et al., 2005).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle le glutamate agit sur les canaux AQP₄, possiblement via un mécanisme dépendant de la signalisation calcique astrocytaire comme cela a été mis en évidence dans la dépression corticale (Enger et al., 2017). Les canaux d'AQP₄ interagiraient ensuite avec la Cx30 pour moduler la morphologie astrocytaire. Afin d'explorer cette hypothèse, nous pourrions observer les changements de niveaux d'expression de l'AQP₄ dans les souris déficientes en Cx30 en conditions basales et en conditions d'administration de cocaïne. De plus, nous pourrions bloquer sélectivement les canaux AQP₄, pharmacologiquement avec du TGN-020 par exemple (Pirici et al., 2018), *ex vivo* dans le NAc de ces souris afin d'observer les éventuels changements de transmission glutamatergique dans les MSNs.

2.2 Changement de la transmission dopaminergique dans le NAc en l'absence de Cx30

Nous avons observé dans le NAc à la suite d'administration de cocaïne, que le ratio DOPAC/DA était diminué (Figure 26). Ceci peut s'expliquer par l'action de la cocaïne, qui en bloquant les transporteurs à la dopamine, inhibe leur capture, et donc leur métabolisation en DOPAC. Cependant, ce ratio n'est pas modifié après administration de cocaïne dans les souris déficientes en Cx30. De plus, il a été observé par microdialyse *in vivo* que ces souris présentaient à la fois une plus faible augmentation de dopamine à la suite d'injections de cocaïne, mais aussi un niveau basal de dopamine plus faible (Figure 28). Ces résultats nous indiquent que les astrocytes déficients en Cx30 ont une influence sur le niveau basal de dopamine, ce qui engendre une réduction des effets de la cocaïne sur les changements des niveaux de DA dans le NAc. Une hypothèse que l'on peut émettre pour expliquer ces phénomènes est de supposer que la dopamine est plus capturée par les astrocytes déficients en Cx30, dont les prolongements sont plus proches des synapses, comme le montrent nos données de super-resolution (Figure 21). Cet effet a été observé dans l'hippocampe et réduit la transmission glutamatergique (Pannasch et al., 2014), et il a récemment été montré que les astrocytes sont responsables de l'homéostasie dopaminergique dans le cortex (Petrelli et al., 2018). Il a d'ailleurs été montré qu'inhiber les transporteurs dopaminergiques astrocytaires en même temps qu'injecter de la cocaïne augmente les effets locomoteurs de la cocaïne (Huertas et al., 2015). Pour tester cette hypothèse, il serait donc judicieux d'utiliser la quinidine, un inhibiteur du transporteur dopaminergique astrocytaire OCT, associé à l'injection de la cocaïne dans les souris déficientes en Cx30. De façon alternative et plus spécifique, une approche moléculaire par shRNA ciblant sélectivement les OCT astrocytaires via l'injection de virus dans le NAc est envisageable.

De plus, ces changements de niveau de dopamine dans les souris déficientes en Cx30 pourraient expliquer les résultats observés lors des expériences d'activité locomotrice (Figure 14). En effet, il a été montré que les niveaux de dopamine dans le NAc sont

directement liés à l'activité locomotrice induite par la cocaïne (Vazquez-Derose et al., 2013). Ainsi, nous observons une augmentation des niveaux de dopamine dans le NAc et un accroissement de l'activité locomotrice après les injections aiguës de cocaïne dans les souris déficientes en Cx30. Cependant, ces augmentations de concentration de dopamine et d'activité locomotrice sont plus faibles que celles observées dans les souris sauvages.

Par ailleurs, il se peut que les modifications morphologiques astrocytaires induites par l'absence de Cx30 altèrent la capture de dopamine par les astrocytes. En effet, les astrocytes peuvent transporter la dopamine (Hösli & Hösli, 1997). Il serait donc intéressant d'étudier la capture de la dopamine par les astrocytes après injections de cocaïne en absence de Cx30.

Il est aussi intéressant de noter que la transmission dopaminergique peut aussi être un déclencheur de réactivité astrocytaire. En effet, il a été montré que l'augmentation de dopamine induit une libération de TNF- α par les astrocytes, ce qui a pour conséquence d'induire une mort neuronale (S. Ding et al., 2016). Toutefois il a aussi été montré qu'une diminution de la transmission dopaminergique pouvait s'accompagner de réactivité astrocytaire. En effet, l'activation des récepteurs à la dopamine D2 induit une suppression de la neuroinflammation dans la substance noire (Shao et al., 2013).

Dans notre modèle, une réactivité astrocytaire est présente en conditions d'augmentation de l'activité dopaminergique, et la diminution des niveaux de dopamine s'accompagne d'une baisse de réactivité. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les deux phénomènes évoluent de manière similaire et que l'absence de réactivité astrocytaire dans les souris déficientes en Cx30 réduit la transmission dopaminergique, même à un niveau basal. Il a d'ailleurs récemment été montré qu'une augmentation de dopamine induit une réactivité astrocytaire (Mashima et al., 2018). Il serait donc intéressant d'inhiber spécifiquement, avec par exemple des vecteurs viraux (cf. Figure 29) la réactivité astrocytaire dans les souris sauvages, puis de mesurer les niveaux dopaminergiques de base et induits par la cocaïne dans le NAc.

2.3. Lien entre les changements de transmissions dopaminergique et glutamatergique

En contexte d'administration de cocaïne, l'augmentation de dopamine influence la transmission glutamatergique, notamment par le biais de modifications des récepteurs AMPA. En effet, les niveaux élevés de dopamine induisent une augmentation des sous-unités GluR1 du récepteur AMPA dans le PFC et dans le NAc, via l'activation des récepteurs D1, montré dans un modèle *in vitro* (C. Gao & Wolf, 2007; Wolf, Mangiavacchi, & Sun, 2003). Cette sous-unité est particulièrement importante pour la transmission glutamatergique rapide, et essentielle à la mise en place d'une plasticité (Lee et al., 2003). Par ailleurs, ce lien a aussi été établi dans l'hippocampe, et il a aussi été observé dans cette région que la dopamine induit une augmentation du MicroARN MiR-181a, qui inhibe l'expression de la sous-unité GluA2 du récepteur AMPA (R. Saba et al., 2012; W. B. Smith, Starck, Roberts, & Schuman, 2005). Ainsi, la dopamine a une action directe sur les récepteurs glutamatergiques et leur

plasticité, et influence donc la transmission glutamatergique. Il serait donc intéressant d'évaluer le niveau d'expression des sous-unités du récepteur AMPA dans les MSNs du NAc des souris déficientes en Cx30 après injections de cocaïne et de solution saline, et le comparer à celle des souris sauvages. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que dans notre modèle de souris déficientes en Cx30, l'absence de plasticité glutamatergique pourrait être due à la réduction des niveaux de dopamine dans le NAc. Pour tester cette hypothèse, nous pouvons activer sélectivement les récepteurs à la dopamine dans le NAc dans les souris déficientes en Cx30, puis mesurer les courants glutamatergiques induits par la cocaïne.

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'après injections de méthamphétamine, il a été montré que les niveaux de Cx43 astrocytaire étaient diminués, ainsi que l'activité jonctionnelle et hémicanal des Cxs (Castellano, Nwagbo, Martinez, & Eugenin, 2016). Les auteurs ont utilisé des bloqueurs pharmacologiques des récepteurs à la dopamine, notamment le SCH23390, un antagoniste des récepteurs D₁, et ont observé des diminutions d'activités jonctionnelle sous-tendue par la Cx43, qui influent sur la libération de glutamate (Castellano et al., 2016). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en l'absence de Cx30, et avec une transmission dopaminergique diminuée dans le NAc même après injections de cocaïne, il y a une inhibition de la mise en place d'une plasticité glutamatergique. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'infuser de la dopamine dans le NAc des souris déficientes en Cx30 afin d'observer si une plasticité glutamatergique induite par la cocaïne se met en place.

3. LES ASTROCYTES COMME CIBLES THERAPEUTIQUES POTENTIELLES CONTRE LES EFFETS DE LA COCAÏNE ET LA MISE EN PLACE D'UNE ADDICTION

3.1. Inhibition de la réactivité astrocytaire dans le NAc

Il est intéressant de noter que le profil inflammatoire induit par la cocaïne est un facteur dans la mise en place d'une addiction. Ainsi, différentes études ont montré qu'en réduisant cette inflammation, les effets moléculaires et comportementaux induits par la cocaïne étaient inhibés (Merkel, 2017; Merkel, Andrews, et al., 2017; R. Schneider et al., 2015; Zhu et al., 2018). De plus, une étude publiée cette année fait le parallèle spécifiquement entre la réactivité astrogliale et les comportements induits par la cocaïne (Mai et al., 2019). En effet, les auteurs montrent qu'en diminuant l'expression du glutathione-peroxidase1 (GPx-1, une molécule résultant d'un stress oxydatif, présente en conditions réactives) ou en inhibant la voie JAK/STAT₃ pharmacologiquement, ils réduisent les effets comportementaux induits par la cocaïne.

Nous nous sommes aussi intéressées à cette voie de signalisation, et nous notons un lien entre l'induction de la voie JAK/STAT₃ et l'augmentation de la Cx30. Ainsi, dans le but de réduire les effets de la cocaïne, il serait approprié d'inhiber spécifiquement cette voie *in vivo* dans le NAc. Nous avons fait cette expérience en inhibant sélectivement cette voie dans les astrocytes accumbaux via l'injection d'un virus exprimant SOCS₃ (collaboration C. Escartin, MIRCen). Ces expériences n'ont pas permis de modifier l'activité locomotrice induite par la cocaïne. Ceci suggère soit que la réactivité astrogliale n'est pas le paramètre

principal important dans l'effet locomoteur de la cocaïne, soit probablement que ce n'est pas que le NAc qui est impliqué dans cet effet de la cocaïne. On sait notamment déjà que la cocaïne augmente aussi l'expression de la Cx30 dans le PFC. Il serait donc particulièrement intéressant d'inhiber la voie JAK/STAT dans plusieurs régions cérébrales impliquées dans le circuit de l'addiction.

3.2. Altération de fonctions astrocytaires

Les astrocytes contribuent à la mise en place d'une addiction à la cocaïne de diverses manières. Il a déjà été proposé qu'inhiber la libération de lactate par les astrocytes, important pour la formation de la mémoire (Boury-Jamot, Halfon, Magistretti, & Boutrel, 2016), empêche la mise en place d'une « mémoire de la drogue », et réduit les risques de rechute sur le long-terme (Yan Zhang et al., 2016). De plus, nous savons que ces fonctions de support métabolique via le lactate sont notamment sous-tendues par les activités jonctionnelles des connexines astrocytaires (Rouach et al., 2008), ainsi l'altération des connexines pourrait empêcher la mise en place d'une « mémoire de la drogue ».

Par ailleurs, la capacité des astrocytes à libérer des facteurs neurotrophiques comme le GDNF en fait des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, le GDNF a été mis en cause dans les mécanismes de l'addiction comme ayant un effet protecteur de la mise en place d'une addiction (Carnicella & Ron, 2009; Ron & Janak, 2005). Il a ainsi été montré une diminution des effets de la cocaïne après injection intracérébrale d'astrocytes humains libérant du GDNF (Green-Sadan et al., 2003). Or nous savons aussi que l'absence de Cx30 altère la libération de GDNF (Fujita et al., 2018). Il serait donc intéressant d'étudier comment cette signalisation astrocytaire est modifiée par la cocaïne, en fonction des niveaux de Cx30.

Tous les liens que nous avons pu établir entre la Cx30 et les modifications moléculaires, morphologiques, électrophysiologiques et comportementales induites par la cocaïne font de la Cx30 un candidat idéal de cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'addiction.

PARTIE III : Cx30 et Réactivité Astrocytaire

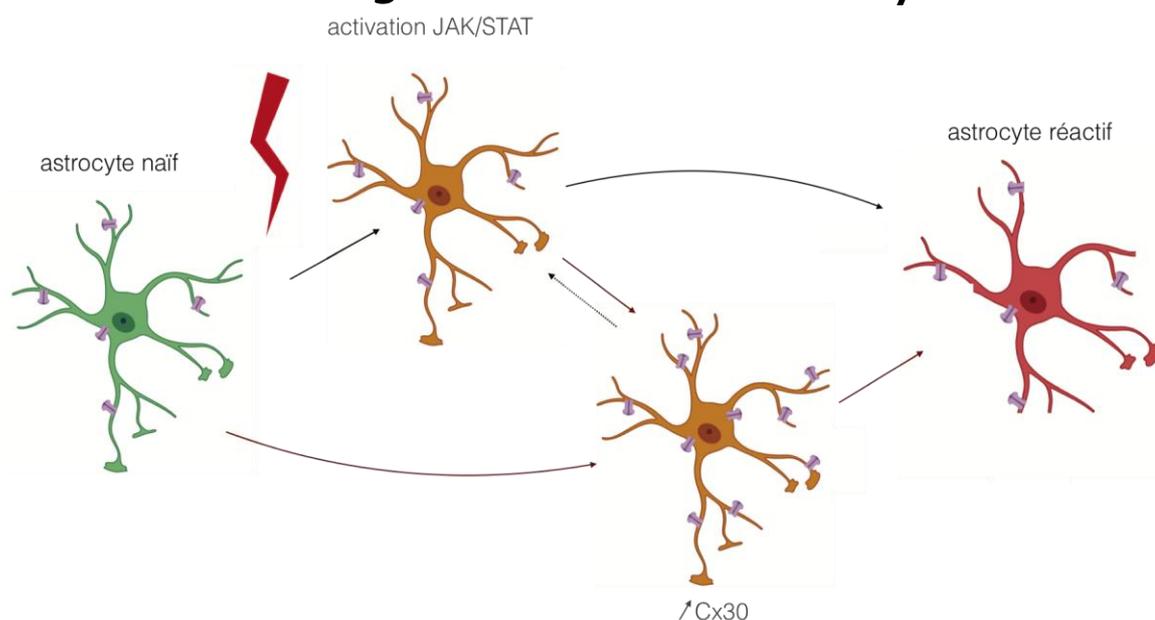


Figure 35 : Schéma récapitulatif des observations sur le rôle de la Cx30 dans la réactivité astrocytaire. Un astrocyte naif (1) devient réactif et présente des modifications morphologiques (4) après une blessure du système nerveux central (éclair rouge). Nous savons qu'après une blessure, la voie JAK/STAT est activée (2, flèche de 1 à 2), ce qui engendre un phénotype réactif (flèche de 2 à 4). Nous avons aussi observé qu'une blessure du système nerveux central entraîne une augmentation des niveaux de Cx30 (3, flèche de 1 à 3), que l'activation de la voie JAK/STAT augmente les niveaux de Cx30 (flèche de 2 à 3), et que l'augmentation des niveaux de Cx30 engendre un phénotype de réactivité astrocytaire (flèche de 3 à 4). Cependant, nous ne savons pas encore si l'augmentation des niveaux de Cx30 induit une activation de la voie JAK/STAT (flèche en pointillés de 3 à 2).

1. LA CX30, UN MARQUEUR DE LA REACTIVITE ASTROCYTAIRE ?

Nous avons observé *in vivo*, dans toutes les conditions réactives étudiées (cocaïne, blessure aiguë, épilepsie du lobe temporal, stimulation directe de la voie JAK/STAT₃) une augmentation des niveaux de Cx30 dans la zone concernée (Figures 29, 30, 32 et 35). Un facteur connu pouvant expliquer ce résultat est le facteur neurotrophique NFκB. En effet, cette molécule est augmentée dans les astrocytes réactifs, et a été par ailleurs impliquée dans la régulation de l'expression de la Cx30 (et Cx26) dans l'oreille interne (Ortolano et al., 2008). Ainsi, l'augmentation de NFκB induite par la réactivité pourrait être un facteur participant à l'augmentation des niveaux de Cx30.

Par ailleurs, étant donné que nous avons montré que la stimulation directe de la voie JAK/STAT₃ augmente l'expression de la Cx30, il serait judicieux de tester si STAT₃ régule directement au niveau transcriptionnel l'expression de la Cx30. Ceci serait en accord avec des travaux réalisés sur la Cx43 où la voie de signalisation JAK/STAT₃ régule la transcription de la Cx43 (Ozog et al., 2004).

Une autre piste à explorer serait d'étudier le lien entre la Cx30 et le facteur de transcription Sox9 en conditions réactives. En effet, il a été montré qu'une réactivité induit une augmentation de l'expression de Sox9 dans les astrocytes (Kordes & Hagel, 2006; Shin

et al., 2013). Par ailleurs, nous savons aussi que Sox9 module l'expression de la Cx30 (Ernst et al., 2011). Par ailleurs, d'autres canaux membranaires telles que l'AQP4 ou la Cx43 sont modifiés en conditions réactives (Manley et al., 2009; Simard & Nedergaard, 2004). Pour la Cx43, il a été montré qu'en condition neuroinflammatoire, la production de cytokines réduit l'expression de la Cx43 (Même et al., 2006; Retamal et al., 2007). De plus, des mécanismes compensatoires d'expression des connexines 30 et 43 ont été identifiés dans les souris déficientes en Cx43 (Theis et al., 2003). Il est donc possible que la réactivité induisant une diminution de Cx43, les niveaux de Cx30 soient augmentés dans le but de compenser la perte de Cx43.

Concernant l'AQP4, ces niveaux d'expression influencent ceux de la Cx30 (Katozi et al., 2017), et serait donc ainsi un acteur de cette augmentation en conditions réactives.

2. LA CX30, UN INDUCTEUR DE LA REACTIVITE ASTROCYTAIRE ?

2.1. Inhibition de la réactivité astrocytaire en absence de Cx30

Tout d'abord, nous avons observé une absence de morphologie de type « réactive » dans les astrocytes déficients en Cx30. Nous nous sommes donc posés la question de savoir si la Cx30, et donc son absence, n'était que le médiateur des changements morphologiques astrocytaires induits par la réactivité. Dans ce but, nous avons identifié plusieurs marqueurs de réactivité astrocytaire, et ils se trouvent être diminués en l'absence de Cx30. Notons qu'en plus de ces marqueurs astrocytaires de réactivité, le marqueur de réactivité microgliale Iba1 est aussi réduit (Figures 29, 32, 33), ce qui suggère que la Cx30 ne régule pas uniquement les changements morphologiques induits lors de la réactivité astrocytaire. De plus, des observations similaires ont été faites dans des modèles de pathologies cérébrales neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaques (Fang et al., 2018; Fujita et al., 2018)

Ainsi, la Cx30 aurait un rôle plus profond dans les modulations de la réactivité, et pas seulement celui de gouverner les changements morphologiques.

Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Nous avons déjà établi que l'absence de Cx30 modifiait la morphologie astrocytaire (cf. Introduction, partie 5). Ainsi, des astrocytes déficients en Cx30 et plus ramifiés auraient un impact sur la transmission neuronale via la capture de neurotransmetteurs et l'homéostasie ionique, tous étant des facteurs importants de la régulation de la réactivité astrocytaire. Ainsi, la couverture physique formée par les astrocytes serait un frein à la circulation de molécules excitatrices et inflammatoires, notamment.

Cependant, nous avons aussi établi que l'influence de la Cx30 ne se résume pas uniquement aux modifications de morphologie astrocytaire. Il est donc pertinent de s'intéresser aux autres fonctions de la Cx30, c'est-à-dire ses fonctions hémicanal et jonctionnelle. Concernant sa capacité à former des hémicanaux fonctionnels (Ghézali et al., 2019), l'absence de Cx30 pourrait avoir pour conséquence des altérations de libération de gliotransmetteurs, ou d'autres molécules comme des cytokines. Ce mécanisme empêcherait donc la mise en place d'une réactivité astrocytaire.

Enfin, la Cx30 est aussi en mesure de former des jonctions communicantes avec les astrocytes voisins et participent ainsi à la formation et au maintien d'un réseau astrocytaire.

De plus, nous savons que la réactivité astrocytaire s'accompagne d'une hyperactivité calcique à travers le réseau astrocytaire (Cheli et al., 2016; Gurkoff, Shahlaie, Lyeth, & Berman, 2013). Ainsi, la déficience en Cx30 pourrait inhiber la propagation des vagues calciques à travers le réseau astrocytaire, ce qui empêcherait l'établissement de la réactivité astrogliale. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse en inhibant la signalisation calcique astrocytaire dans des souris sauvages, et de tester si une réactivité astrocytaire peut être inductible.

Par ailleurs, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant le rôle de la Cx30 dans la réactivité astrocytaire, nous pourrions tester quelles fonctions de la Cx30 sont impliquées dans la réactivité. Par exemple, nous pourrions utiliser le modèle de souris transgéniques Cx30^{T5M/T5M}, dans lesquelles les fonctions canal sont inactivées mais les fonctions canal-indépendantes sont intactes. Il serait pertinent d'induire une réactivité astrocytaire dans ces souris et comparer son expression à celle des souris déficientes en Cx30.

2.2. Mise en place d'une réactivité astrocytaire sous le contrôle de la Cx30

Nous avons observé que non seulement la Cx30 est augmentée en conditions réactives, mais aussi que son absence inhibe la réactivité astrocytaire (Figures 29-31) et que sa surexpression est suffisante pour induire une réactivité astrocytaire (Figure 33). Il est donc particulièrement intéressant de s'interroger sur le mécanisme sous-tendant la régulation positive de la réactivité astrocytaire par la Cx30

Nous pouvons émettre ici encore plusieurs hypothèses. D'abord, il se pourrait que la Cx30 induise une réactivité astrocytaire via la voie de signalisation Erk. En effet, cette voie de signalisation sous-tendue par une protéine kinase a un effet neuroprotecteur lorsqu'elle est activée (B. H. Han & Holtzman, 2000). En particulier, en conditions d'astroglie, l'activation de cette voie de signalisation aurait des effets bénéfiques sur la survie neuronale (Nan et al., 2017; J. Saba et al., 2018; Wu et al., 2017). Or, il a aussi été montré que la Cx30 inhibe la mise en place de cette voie de signalisation (Arun, Vanisree, & Ravisankar, 2016). Ainsi, une surexpression de Cx30 inhiberait de manière non physiologique la voie protectrice Erk, ce qui pourrait avoir pour conséquence la mise en place d'une réactivité astrocytaire.

Similairement, il a été montré que l'inhibition de la voie Rho-kinase était bénéfique pour la mise en place d'une cicatrice gliale et pour la survie neuronale (Abeysinghe, Phillips, Chin-Cheng, Beart, & Roulston, 2016; Bye, Christie, Turbic, Basrai, & Turnley, 2016), réduisait la signalisation pro-inflammatoire telle que la sécrétion de cytokines (Guo et al., 2014) et la réactivité astrocytaire (Tura, Schuettauf, Monnier, Bartz-Schmidt, & Henke-Fahle, 2009). Par ailleurs, un lien a été identifié entre les niveaux d'expression de la Cx43 et l'activation des Rho kinases, où l'activation des Rho kinases diminuait les niveaux d'expression de la Cx43 (Mattii et al., 2019). Comme il semblerait que les niveaux d'expression de Cx43 et de Cx30 évoluent à l'opposé en conditions réactives, l'augmentation de la Cx30 pourrait induire une augmentation des Rho kinases, et ainsi la mise en place en place d'une réactivité. Par ailleurs, l'interaction fonctionnelle directe entre Cx30 et Rho a été montré il y a peu de temps au sein du laboratoire : en effet, lors du développement, la Cx30 induit un recrutement de la Rho GTPases cdc42 (Ghézali et al., 2018).

De plus, il serait intéressant de regarder l'augmentation des niveaux de Cx30 induit une activation de la voie JAK/STAT (Figure 35).

Pour conclure, ce projet a montré que la Cx30 n'est pas seulement une nouvelle molécule dont l'expression est modifiée en conditions de réactivité astrocytaire, mais aussi une protéine dont les changements d'expression modulent la mise en place d'une réactivité. Il est important de noter que l'ensemble des modifications induites par une réactivité astrocytaire n'a pas pu être analysée (cf. définition en Introduction) et qu'une analyse transcriptionnelle complémentaire est nécessaire dans nos modèles, afin de conclure à la présence ou non d'une réactivité astrocytaire. Cependant, même si l'entièreté de la définition n'est pas retrouvée, nos résultats ont pu établir que la réduction de Cx30 inhiberait la réactivité astrocytaire et que la surexpression de Cx30 l'induirait. Ainsi, nous nous interrogeons maintenant sur les mécanismes sous-jacents à ces observations. Notamment, nous voudrions étudier quelles fonctions de la Cx30 sont acteurs de la réactivité astrogliale. Pour ce faire, nous pouvons utiliser des modèles de souris transgéniques ou des bloqueurs spécifiques des jonctions communicantes et hémicanaux. Il serait aussi intéressant de connaître les voies de signalisation intracellulaire sous-jacentes au lien entre la Cx30 et la réactivité. De plus, nous nous interrogeons sur le rôle protecteur de l'absence de Cx30 en conditions pathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Aasen, T., Leithe, E., Graham, S. V., Kameritsch, P., Mayán, M. D., Mesnil, M., ... Tabernero, A. (2019). Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene*.
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-0741-6>
- Abeyasinghe, H. C. S., Phillips, E. L., Chin-Cheng, H., Beart, P. M., & Roulston, C. L. (2016). Modulating astrocyte transition after stroke to promote brain rescue and functional recovery: Emerging targets include Rho Kinase. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17030288>
- Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J. P., ... Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *GLIA*, 63(5), 795–811. <https://doi.org/10.1002/glia.22785>
- Adams, K. L., & Gallo, V. (2018). The diversity and disparity of the glial scar. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0033-9>
- Adelman, W. J., & Fitzhugh, R. (1975). Solutions of the Hodgkin Huxley equations modified for potassium accumulation in a periaxonal space. *Federation Proceedings*.
- Agulhon, C., Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2010). Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1184821>
- Agulhon, C., Sun, M. Y., Murphy, T., Myers, T., Lauderdale, K., & Fiacco, T. A. (2012). Calcium signaling and gliotransmission in normal vs. Reactive astrocytes. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00139>
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Alfonso-Loeches, S., Ureña-Peralta, J. R., Morillo-Bargues, M. J., La Cruz, J. O. De, & Guerri, C. (2014). Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00216>
- Allen, N. J. (2014). Astrocyte Regulation of Synaptic Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013053>
- Allen, N. J., Bennett, M. L., Foo, L. C., Wang, G. X., Chakraborty, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2012). Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11059>
- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., ... Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'shea, T. M., Kawaguchi, R., ... Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Aracil-Fernández, A., Trigo, J. M., García-Gutiérrez, M. S., Ortega-Álvaro, A., Ternianov, A., Navarro, D., ... Manzanares, J. (2012). Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB₂ receptors. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.22>
- Aragona, B. J., Cleaveland, N. A., Stuber, G. D., Day, J. J., Carelli, R. M., & Wightman, R. M. (2008). Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus

- accumbens shell by cocaine is attributable to a direct increase in phasic dopamine release events. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2225-08.2008>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., & Haydon, P. G. (1998). Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-17-06822.1998>
- Arun, S., Vanisree, A. J., & Ravisankar, S. (2016). Connexin 30 downregulates Insulin-like growth factor receptor-1, abolishes Erk and potentiates effects of an IGF-R inhibitor in a glioma cell line. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.061>
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09613>
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., ... Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Badisa, R.B., Kumar, S.S., Mazzio, E., ..., Goodman, C.B. (2015) N-Acetyl Cysteine Mitigates the Acute Effects of Cocaine-Induced Toxicity in Astroglia-Like Cells. *PLoS One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114285>
- Bae, J. J., Xiang, Y. Y., Martinez-Canabal, A., Frankland, P. W., Yang, B. B., & Lu, W. Y. (2011). Increased transforming growth factor- β 1 modulates glutamate receptor expression in the hippocampus. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*.
- Baker, D. A., McFarland, K., Lake, R. W., Shen, H., Tang, X., Toda, S., & Kalivas, P. W. (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse, *6*(7), 743–749.
- Bandeira, F., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804650106>
- Barnabé-Heider, F., Wasylnka, J. A., Fernandes, K. J. L., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2005). Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.037>
- Barnett, N. L., & Pow, D. V. (2000). Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J & Herculano-Houzel, S (2016). The Search for True Numbers of Neurons and Glia Cells in the Human Brain: a Review of 150 years of Cell Counting. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Bass, N. H., Hess, H. H., Pope, A., & Thalheimer, C. (1971). Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *Journal of Comparative*

- Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.901430405>
- Bayraktar, O. A., Fuentealba, L. C., Alvarez-Buylla, A., & Rowitch, D. H. (2015). Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020362>
- Bedford, J. A., Karen Lovell, D., Turner, C. E., Elsohly, M. A., & Wilson, M. C. (1980). The anorexic and actometric effects of cocaine and two coca extracts. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90246-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90246-4)
- Beier, K. T., Steinberg, E. E., Deloach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., ... Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Bekar, L. K., He, W., & Nedergaard, M. (2008). Locus coeruleus α -adrenergic-mediated activation of cortical astrocytes in vivo. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhno40>
- Bellesi, M., de Vivo, L., Tononi, G., & Cirelli, C. (2015). Effects of sleep and wake on astrocytes: Clues from molecular and ultrastructural studies. *BMC Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0176-7>
- Bennett, M. V. L., Garré, J. M., Orellana, J. A., Bukauskas, F. F., Nedergaard, M., & Sáez, J. C. (2012). Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.042>
- Bernard, R., Kerman, I. A., Thompson, R. C., Jones, E. G., Bunney, W. E., Barchas, J. D., ... Watson, S. J. (2011). Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.44>
- Beurrier, C., Faideau, M., Bennouar, K. E., Escartin, C., Kerkerian-Le Goff, L., Bonvento, G., & Gubellini, P. (2010). Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008550>
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., & Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn1246>
- Bialas, A. R., & Stevens, B. (2013). TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.3560>
- Bindocci, E., Savtchouk, I., Liaudet, N., Becker, D., Carriero, G., & Volterra, A. (2017). Neuroscience: Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aai8185>
- Bobak, J. B., & Salm, A. K. (1996). Plasticity of astrocytes of the ventral glial limitans subjacent to the supraoptic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961209\)376:2<188::AID-CNE2>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961209)376:2<188::AID-CNE2>3.0.CO;2-#)
- Boddum, K., Jensen, T. P., Magloire, V., Kristiansen, U., Rusakov, D. A., Pavlov, I., & Walker, M. C. (2016). Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13572>
- Bonder, D. E., & McCarthy, K. D. (2014). Astrocytic Gq-GPCR-linked IP₃R-Dependent Ca²⁺ signaling does not mediate neurovascular coupling in mouse visual cortex in vivo. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2591-14.2014>
- Borden, L. a, & Caplan, M. J. (1996). Invited Review Gaba Transporter Heterogeneity : Pharmacology and Cellular Localization Critique. *Critique*.

- Boudreau, A. C., Reimers, J. M., Milovanovic, M., & Wolf, M. E. (2007). Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2163-07.2007>
- Boudreau, A. C., & Wolf, M. E. (2005). Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2252-05.2005>
- Boulay, A.-C., Del Castillo, F. J., Giraudet, F., Hamard, G., Giaume, C., Petit, C., ... Cohen-Salmon, M. (2013). Hearing Is Normal without Connexin30. *Journal of Neuroscience*, 33(2), 430–434. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4240-12.2013>
- Boulay, A. C., Saubameá, B., Adam, N., Chasseigneaux, S., Mazaré, N., Gilbert, A., ... Cohen-Salmon, M. (2017). Translation in astrocyte distal processes sets molecular heterogeneity at the gliovascular interface. *Cell Discovery*.
<https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.5>
- Boury-Jamot, B., Halfon, O., Magistretti, P. J., & Boutrel, B. (2016). Lactate release from astrocytes to neurons contributes to cocaine memory formation. *BioEssays*.
<https://doi.org/10.1002/bies.201600118>
- Bowers, M. S., & Kalivas, P. W. (2003). Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *European Journal of Neuroscience*, 17(6), 1273–1278. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02537.x>
- Bowman, C. L., & Kimelberg, H. K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/311656a0>
- Bowman, C. L., Kimelberg, H. K., Frangakis, M. V., Berwald-Netter, Y., & Edwards, C. (1984). Astrocytes in primary culture have chemically activated sodium channels. *Journal of Neuroscience*.
- Bowser, D. N., & Khakh, B. S. (2007). Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *Journal of General Physiology*.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200709780>
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W. H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., ... Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Experimental Medicine*.
<https://doi.org/10.1084/jem.20041918>
- Bramham, C. R., Torp, R., Zhang, N., Storm-Mathisen, J., & Ottersen, O. P. (1990). Distribution of glutamate-like immunoreactivity in excitatory hippocampal pathways: A semiquantitative electron microscopic study in rats. *Neuroscience*.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90277-B](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90277-B)
- Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., Childress, A. R., Lee, G. S., Bota, R. G., ... Jarvik, M. E. (2002). Brain metabolic changes during cigarette craving. *Archives of General Psychiatry*. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.59.12.1162>
- Burton, A. C., Nakamura, K., & Roesch, M. R. (2015). From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.003>
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C. N., ... Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80781-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80781-3)

- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*.
- Bye, N., Christie, K. J., Turbic, A., Basrai, H. S., & Turnley, A. M. (2016). Rho kinase inhibition following traumatic brain injury in mice promotes functional improvement and acute neuron survival but has little effect on neurogenesis, glial responses or neuroinflammation. *Experimental Neurology*.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.02.012>
- Cahill E, Pascoli V, Trifilieff P, Savoldi D, Kappès V, Lüscher C, et al. (2014): D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol Psychiatry* 19:1295–1304.
- Cai, Z., Schools, G. P., & Kimelberg, H. K. (2000). Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: Developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(20000101\)29:1<70::AID-GLIA7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(20000101)29:1<70::AID-GLIA7>3.0.CO;2-V)
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. *Nature Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nn.3743>
- Calipari ES, Bagot RC, Purushothaman I, Davidson TJ, Yorgason JT, Peña CJ, et al. (2016): In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:2726–2731.
- Capuani, C., Melone, M., Tottene, A., Bragina, L., Crivellaro, G., Santello, M., ... Pietrobon, D. (2016). Defective glutamate and K⁺ clearance by cortical astrocytes in familial hemiplegic migraine type 2. *EMBO Molecular Medicine*.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201505944>
- Carelli, R. M. (2004). Nucleus accumbens cell firing and rapid dopamine signaling during goal-directed behaviors in rats. *Neuropharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.017>
- Carmignoto, G., & Haydon, P. G. (2012). Astrocyte calcium signaling and epilepsy. *GLIA*.
<https://doi.org/10.1002/glia.22318>
- Carmignoto, G., Pasti, L., & Pozzan, T. (1998). On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. *Journal of Neuroscience*.
- Carnicella, S., & Ron, D. (2009). GDNF - A potential target to treat addiction. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.12.001>
- Castellano, P., Nwagbo, C., Martinez, L. R., & Eugenin, E. A. (2016). Methamphetamine compromises gap junctional communication in astrocytes and neurons. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.13603>
- Cearley, C. N., Blindheim, K., Sorg, B. A., Krueger, J. M., & Churchill, L. (2011). Acute cocaine increases interleukin-1 β mRNA and immunoreactive cells in the cortex and nucleus accumbens. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0410-9>
- Ceyzériat, K., Abjean, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ben Haim, L., & Escartin, C. (2016). The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.043>
- Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., ... Escartin, C. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*.

- <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0606-1>
- Chandra R, Lenz JD, Gancarz AM, Chaudhury D, Schroeder GL, Han M-H, et al. (2013): Optogenetic inhibition of D1R containing nucleus accumbens neurons alters cocaine-mediated regulation of Tiam1. *Front Mol Neurosci* 6:13.
- Chao, T. I., Kasa, P., & Wolff, J. R. (1997). Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: Exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *Journal of Comparative Neurology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971117\)388:2<191::AID-CNE2>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971117)388:2<191::AID-CNE2>3.0.CO;2-X)
- Charles, K. J., Calver, A. R., Jourdain, S., & Pangalos, M. N. (2003). Distribution of a GABAB-like receptor protein in the rat central nervous system. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03163-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03163-9)
- Cheli, V. T., Santiago González, D. A., Smith, J., Spreuer, V., Murphy, G. G., & Paez, P. M. (2016). L-type voltage-operated calcium channels contribute to astrocyte activation In vitro. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23013>
- Chen, Ying, Miles, D. K., Hoang, T. N., Shi, J., Hurlock, E., Kernie, S. G., & Lu, Q. R. (2008). The basic helix-loop-helix transcription factor Olig2 is critical for reactive astrocyte proliferation after cortical injury. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3545-08.2008>
- Chen, Yongmei, Vartiainen, N. E., Ying, W., Chan, P. H., Koistinaho, J., & Swanson, R. A. (2001). Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00374.x>
- Cheung, G., Chever, O., Rouach, N., & Orellana, J. A. (2014). CELLULAR NEUROSCIENCE Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00348>
- Chever, O., Lee, C. Y., & Rouach, N. (2014). Astroglial connexin₄₃ hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0015-14.2014>
- Christensen, R., Petersen, A., & Perrier, J.-F. (2013). How do Glial Cells Contribute to Motor Control? *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990384>
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., ... Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>
- Chun, H., & Lee, C. J. (2018). Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.012>
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., ... Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
- Clasadonte, J., & Haydon, P. G. (2014). Connexin 30 controls the extension of astrocytic processes into the synaptic cleft through an unconventional non-channel function. *Neuroscience Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1476-6>
- Codeluppi, S., Svensson, C. I., Hefferan, M. P., Valencia, F., Silldorff, M. D., Oshiro, M., ... Pasquale, E. B. (2009). The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4103-08.2009>
- Condorelli, D. F., Mudò, G., Trovato-Salinaro, A., Mirone, M. B., Amato, G., & Belluardo, N.

- (2002). Connexin-30 mRNA is up-regulated in astrocytes and expressed in apoptotic neuronal cells of rat brain following kainate-induced seizures. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1155>
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>
- Cornish, J. L., & Kalivas, P. W. (2000). Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(15), RC89. <https://doi.org/20004403> [pii]
- Cotrina, M. L., Lin, J. H. C., & Nedergaard, M. (2008). Adhesive Properties of Connexin Hemichannels. *GLIA*, 56(16), 1791–1798. <https://doi.org/10.1002/glia.20728>
- Coulter, D. A., & Eid, T. (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.22341>
- D'Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D. F., Auberson, Y. P., ... Haydon, P. G. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1995–2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609408104>
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
- Daneman, R., & Prat, A. (2014). The Blood Brain Barrier (BBB). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-43787-2>
- Dani, J. W., Chernjavsky, A., & Smith, S. J. (1992). Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90271-E](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90271-E)
- Daré, E., Schulte, G., Karovic, O., Hammarberg, C., & Fredholm, B. B. (2007). Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiology and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.031>
- De Pina-Benabou, M. H., Srinivas, M., Spray, D. C., & Scemes, E. (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *Journal of Neuroscience*.
- Dellavalle, B., Hempel, C., Kurtzhals, J. A. L., & Penkowa, M. (2010). In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.21002>
- Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C. J., Gronostajski, R. M., & Anderson, D. J. (2006). The Transcription Factor NFIA Controls the Onset of Gliogenesis in the Developing Spinal Cord. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.019>
- Deschepper, C. F. (1998). Peptide receptors on astrocytes. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1006/frne.1997.0161>
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India*.
- Di Castro, M. A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., ... Volterra, A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2929>

- Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G., & Lux, H. D. (1980). Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Experimental Brain Research*.
<https://doi.org/10.1007/BF00236151>
- Ding, F., O'Donnell, J., Thrane, A. S., Zeppenfeld, D., Kang, H., Xie, L., ... Nedergaard, M. (2013). α 1-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca²⁺ signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium*.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.09.001>
- Ding, S., Wang, W., Wang, X., Liang, Y., Liu, L., Ye, Y., ... Zhuge, Q. (2016). Dopamine Burden Triggers Neurodegeneration via Production and Release of TNF- α from Astrocytes in Minimal Hepatic Encephalopathy. *Molecular Neurobiology*.
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9445-2>
- Diniz, L. P., Almeida, J. C., Tortelli, V., Lopes, C. V., Setti-Perdigão, P., Stipursky, J., ... Gomes, F. C. A. (2012). Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor β signaling through modulation of d-serine levels in cerebral cortex neurons. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380824>
- Dominguez-Meijide, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017). Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain, Behavior, and Immunity*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.02.013>
- Dong, Q. P., He, J. Q., & Chai, Z. (2013). Astrocytic Ca²⁺ waves mediate activation of extrasynaptic NMDA receptors in hippocampal neurons to aggravate brain damage during ischemia. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.05.005>
- Dong, Y., Taylor, J. R., Wolf, M. E., & Shaham, Y. (2017). Circuit and synaptic plasticity mechanisms of drug relapse. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1821-17.2017>
- Earle, W. J. (2014). DSM-5. *Philosophical Forum*. <https://doi.org/10.1111/phil.12034>
- Eddleston, M., & Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes-Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90380-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90380-X)
- Elias, L. A. B., Turmaine, M., Parnavelas, J. G., & Kriegstein, A. R. (2010). Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5728-09.2010>
- Enger, R., Dukefoss, D. B., Tang, W., Pettersen, K. H., Bjørnstad, D. M., Helm, P. J., ... Nagelhus, E. A. (2017). Deletion of aquaporin-4 curtails extracellular glutamate elevation in cortical spreading depression in awake mice. *Cerebral Cortex*.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhw359>
- Erickson, E. K., Blednov, Y. A., Harris, R. A., & Mayfield, R. D. (2019). Glial gene networks associated with alcohol dependence. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47454-4>
- Ernst, C., Nagy, C., Kim, S., Yang, J. P., Deng, X., Hellstrom, I. C., ... Turecki, G. (2011). Dysfunction of astrocyte connexins 30 and 43 in dorsal lateral prefrontal cortex of suicide completers. *Biological Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.03.038>
- Escartin, C., Brouillet, E., Gubellini, P., Trioulier, Y., Jacquard, C., Smadja, C., ... Bonvento, G. (2006). Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate

- transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0302-06.2006>
- Escartin, C., Guillemaud, O., & Carrillo-de Sauvage, M. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
- Escartin, C., & Rouach, N. (2013). Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Frontiers in Neuroenergetics*. <https://doi.org/10.3389/fnene.2013.00004>
- Evans, C. J., & Cahill, C. M. (2016). Neurobiology of opioid dependence in creating addiction vulnerability. *F1000Research*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8369.1>
- Fang, M., Yamasaki, R., Li, G., Masaki, K., Yamaguchi, H., Fujita, A., ... Kira, J. I. (2018). Connexin 30 deficiency attenuates chronic but not acute phases of experimental autoimmune encephalomyelitis through induction of neuroprotective microglia. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02588>
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004>
- Fellin, T., D'Ascenzo, M., & Haydon, P. G. (2007). Astrocytes Control Neuronal Excitability in the Nucleus Accumbens. *The Scientific World JOURNAL*, 7, 89–97. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.195>
- Ferguson, S. M., Eskenazi, D., Ishikawa, M., Wanat, M. J., Phillips, P. E. M., Dong, Y., ... Neumaier, J. F. (2011). Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2703>
- Francis, D., Stergiopoulos, K., Ek-Vitorín, J. F., Feng, L. C., Taffet, S. M., & Delmar, M. (1999). Connexin diversity and gap junction regulation by pH. *Developmental Genetics*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1999\)24:1/2<123::AID-DVG12>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1999)24:1/2<123::AID-DVG12>3.0.CO;2-H)
- Freche, D., Pannasch, U., Rouach, N., & Holcman, D. (2011). Synapse geometry and receptor dynamics modulate synaptic strength. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025122>
- Fresu, L., Dehpour, A., Genazzani, A. A., Carafoli, E., & Guerini, D. (1999). Plasma membrane calcium ATPase isoforms in astrocytes. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199911\)28:2<150::AID-GLIA6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199911)28:2<150::AID-GLIA6>3.0.CO;2-7)
- Fujii, Y., Maekawa, S., & Morita, M. (2017). Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13243-0>
- Fujita, A., Yamaguchi, H., Yamasaki, R., Cui, Y., Matsuoka, Y., Yamada, K. ichi, & Kira, J. ichi. (2018). Connexin 30 deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1251-0>
- Gajardo-Gómez, R., Labra, V. C., & Orellana, J. A. (2016). Connexins and pannexins: New insights into microglial functions and dysfunctions. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00086>
- Gallo, V., & Deneen, B. (2014). Glial development: The crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.010>
- Ganguly, P., Honeycutt, J. A., Rowe, J. R., Demaestri, C., & Brenhouse, H. C. (2019). Effects

- of early life stress on cocaine conditioning and AMPA receptor composition are sex-specific and driven by TNF. *Brain, Behavior, and Immunity*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.006>
- Gao, C., & Wolf, M. E. (2007). Dopamine alters AMPA receptor synaptic expression and subunit composition in dopamine neurons of the ventral tegmental area cultured with prefrontal cortex neurons. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2925-07.2007>
- Gao, S. Q., Zhang, H., He, J. G., Zheng, H. L., Zhang, P. W., Xu, J. F., ... Chen, J. G. (2019). Neuronal HMGB1 in nucleus accumbens regulates cocaine reward memory. *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/adb.12739>
- Garavan, H., Pankiewicz, J., Bloom, A., Cho, J. K., Sperry, L., Ross, T. J., ... Stein, E. A. (2000). Cue-induced cocaine craving: Neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *American Journal of Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.11.1789>
- Garavan, Hugh, Kaufman, J. N., & Hester, R. (2008). Acute effects of cocaine on the neurobiology of cognitive control. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0106>
- Ge, W. P., Miyawaki, A., Gage, F. H., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2012). Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature10959>
- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E., & Knott, G. W. (2006). Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040343>
- Ghézali, G., Calvo, C. F., Pillet, L. E., Llense, F., Ezan, P., Pannasch, U., ... Rouach, N. (2018). Connexin 30 controls astroglial polarization during postnatal brain development. *Development (Cambridge, England)*. <https://doi.org/10.1242/dev.155275>
- Ghézali, G., Vasile, F., Curry, N., Fantham, M., Cheung, G., Ezan, P., ... Rouach, N. (2019). Neuronal Activity Drives Astroglial Connexin 30 in Perisynaptic Processes and Shapes Its Functions. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz123>
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., & Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions.
<https://doi.org/10.1038/nrn2757>
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C., & Sáez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00088>
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-κB: Players, pathways, perspectives. *Oncogene*.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954>
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2002). Drug Addiction and Its Underlying Neurobiological Basis: Neuroimaging Evidence for the Involvement of the Frontal Cortex. *Am J Psychiatry*, 159(10), 1642–1652.
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications Rita. *Nat Rev Neurosci*, 12(11), 652–669.
<https://doi.org/10.1038/nrn3119>.Dysfunction
- Gómez-Casati, M. E., Murtie, J. C., Rio, C., Stankovic, K., Liberman, M. C., & Corfas, G. (2010). Nonneuronal cells regulate synapse formation in the vestibular sensory epithelium via erbB-dependent BDNF expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008938107>

- Gomez, J., Zafra, F., Olivares, L., Giménez, C., & Aragón, C. (1995). Regulation by phorbol esters of the glycine transporter (GLYT1) in glioblastoma cells. *BBA - Biomembranes*. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)00249-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)00249-0)
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), 1–19. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110051>
- Gordon, G. R. J., Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20543>
- Grabowski, J. (1984). Cocaine 1984: introduction and overview. *NIDA Research Monograph Series*.
- Green-Sadan, T., Kinor, N., Roth-Deri, I., Geffen-Aricha, R., Schindler, C. J., & Yadid, G. (2003). Transplantation of glial cell line-derived neurotrophic factor-expressing cells into the striatum and nucleus accumbens attenuates acquisition of cocaine self-administration in rats. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02943.x>
- Grewer, C., Gameiro, A., Zhang, Z., Tao, Z., Braams, S., & Rauen, T. (2008). Glutamate forward and reverse transport: From molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.98>
- Grimaldi, M., Favit, A., & Alkon, D. L. (1999). cAMP-induced cytoskeleton rearrangement increases calcium transients through the enhancement of capacitative calcium entry. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47-33557>
- Gris, P., Tighe, A., Levin, D., Sharma, R., & Brown, A. (2007). Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20537>
- Grosely, R., & Sorgen, P. L. (2013). A history of gap junction structure: Hexagonal arrays to atomic resolution. *Cell Communication and Adhesion*. <https://doi.org/10.3109/15419061.2013.775256>
- Grüsser, S. M., Wrase, J., Klein, S., Hermann, D., Smolka, M. N., Ruf, M., ... Heinz, A. (2004). Cue-induced activation of the striatum and medial prefrontal cortex is associated with subsequent relapse in abstinent alcoholics. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1828-4>
- Guan, X., Wilson, S., Schlender, K. K., & Ruch, R. J. (1996). Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 β -glycyrrhetic acid. *Molecular Carcinogenesis*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199607\)16:3<157::AID-MC6>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199607)16:3<157::AID-MC6>3.0.CO;2-E)
- Guo, M. F., Meng, J., Li, Y. H., Yu, J. Z., Liu, C. Y., Feng, L., ... Ma, C. G. (2014). The inhibition of Rho kinase blocks cell migration and accumulation possibly by challenging inflammatory cytokines and chemokines on astrocytes. *Journal of the Neurological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.05.034>
- Gurkoff, G., Shahlaie, K., Lyeth, B., & Berman, R. (2013). Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph6070788>
- Haas, B., Schipke, C. G., Peters, O., Söhl, G., Willecke, K., & Kettenmann, H. (2006). Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi101>
- Hai-Feng, L., Peng-Fei, W., Yuan-Jian, W., ..., Jian-Guo, C. (2014) Interactions between N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor and GluR2 in the Nucleus Accumbens Contribute to the Expression of Locomotor Sensitization to Cocaine. *The Journal of Neuroscience* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2594-13.2014>

- Haim, L. Ben, Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzériat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Haj-Yasein, N. N., Jensen, V., Østby, I., Omholt, S. W., Voipio, J., Kaila, K., ... Nagelhus, E. A. (2012). Aquaporin-4 regulates extracellular space volume dynamics during high-frequency synaptic stimulation: A gene deletion study in mouse hippocampus. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.22319>
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J. H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007>
- Hamby, M. E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D. H., Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1256-12.2012>
- Hamby, M. E., Hewett, J. A., & Hewett, S. J. (2006). TGF- β 1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20411>
- Hamilton, N. B., & Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2803>
- Han, B. H., & Holtzman, D. M. (2000). BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-15-05775.2000>
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., ... Nedergaard, M. (2013). Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.015>
- Hansen, D. B., Braunstein, T. H., Nielsen, M. S., & Macaulay, N. (2014). Distinct permeation profiles of the connexin 30 and 43 hemichannels. In *FEBS Letters* (pp. 1446–1457). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.036>
- Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., Saito, T., ... Okada, S. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.4354>
- Hawrylak, N., Fleming, J. C., & Salm, A. K. (1998). Dehydration and rehydration selectively and reversibly alter glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus and subjacent glial limitans. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199803\)22:3<260::AID-GLIA5>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199803)22:3<260::AID-GLIA5>3.0.CO;2-9)
- He, D. H., Feng, Y., Mei, L., Yun, L., & He, C. F. (2009). [Screening and identification interaction proteins of connexin 30]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi = Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*.
- He, F., Ge, W., Martinowich, K., Becker-Catania, S., Coskun, V., Zhu, W., ... Sun, Y. E. (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn1440>
- Hegeman, D. J., Hong, E. S., Hernández, V. M., & Chan, C. S. (2016). The external globus pallidus: Progress and perspectives. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.13196>
- Heien, M. L. A. V., Khan, A. S., Ariansen, J. L., Cheer, J. F., Phillips, P. E. M., Wassum, K. M., & Wightman, R. M. (2005). Real-time measurement of dopamine fluctuations after

- cocaine in the brain of behaving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504657102>
- Heinsbroek JA, Neuhofer DN, Griffin WC, Siegel GS, Bobadilla A-C, Kupchik YM, Kalivas PW (2017): Loss of plasticity in the D2- accumbens pallidal pathway promotes cocaine seeking. *J Neurosci* 37:757–767.
- Heimer, L., Zahm, D. S., Churchill, L., Kalivas, P. W., & Wohltmann, C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90202-Y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90202-Y)
- Heimfarth, L., da Silva Ferreira, F., Pierozan, P., Loureiro, S. O., Mingori, M. R., Moreira, J. C. F., ... Pessoa-Pureur, R. (2016). Calcium signaling mechanisms disrupt the cytoskeleton of primary astrocytes and neurons exposed to diphenylditelluride. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.023>
- Heimfarth, L., da Silva Ferreira, F., Pierozan, P., Mingori, M. R., Moreira, J. C. F., da Rocha, J. B. T., & Pessoa-Pureur, R. (2017). Astrocyte-neuron interaction in diphenyl ditelluride toxicity directed to the cytoskeleton. *Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.01.015>
- Heinz, A., Wrase, J., Kahnt, T., Beck, A., Bromand, Z., Grüsser, S. M., ... Mann, K. (2007). Brain activation elicited by affectively positive stimuli is associated with a lower risk of relapse in detoxified alcoholic subjects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00406.x>
- Hepp, R., Perraut, M., Chasserot-Golaz, S., Galli, T., Aunis, D., Langley, K., & Grant, N. J. (1999). Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199908\)27:2<181::AID-GLIA8>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199908)27:2<181::AID-GLIA8>3.0.CO;2-9)
- Hernandez, N. S., O'Donovan, B., Ortinski, P. I., & Schmidt, H. D. (2019). Activation of glucagon-like peptide-1 receptors in the nucleus accumbens attenuates cocaine seeking in rats. *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/adb.12583>
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., ... Sofroniew, M. V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008>
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., & Robinson, S. R. (1999). Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990815\)57:4<417::AID-JNR1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990815)57:4<417::AID-JNR1>3.0.CO;2-N)
- Hervé, J. C., Derangeon, M., Bahbouhi, B., Mesnil, M., & Sarrouilhe, D. (2007). The connexin turnover, an important modulating factor of the level of cell-to-cell junctional communication: Comparison with other integral membrane proteins. In *Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00232-007-9054-8>
- Heusner CL (2005): Expression of mutant NMDA receptors in dopamine D1 receptor-containing cells prevents cocaine sensitization and decreases cocaine preference. *J Neurosci* 25:6651–6657.
- Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S (2010): Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66:896–907.
- Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q., & Anderson, D. J. (2008). Identification of Positionally Distinct Astrocyte Subtypes whose Identities Are Specified by a Homeodomain Code. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.046>
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte

- intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Holtzclaw, L. A., Pandhit, S., Bare, D. J., Mignery, G. A., & Russell, J. T. (2002). Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.10085>
- Hösli, E., & Hösli, L. (1997). Autoradiographic studies on the uptake of 3H-dopamine by neurons and astrocytes in explant and primary cultures of rat CNS: Effects of uptake inhibitors. *International Journal of Developmental Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(96\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(96)00070-6)
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., & Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008>
- Howard Evans, W., & Leybaert, L. (2007). Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication. *Cell Communication and Adhesion*. <https://doi.org/10.1080/15419060801891034>
- Hsiao, H. Y., Chen, Y. C., Chen, H. M., Tu, P. H., & Chern, Y. (2013). A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor- κ B-dependent inflammation in huntington's disease. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt036>
- Hsieh, H. L., Chi, P. L., Lin, C. C., Yang, C. C., & Yang, C. M. (2014). Up-regulation of ROS-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 from High-Glucose-Challenged Astrocytes Contributes to the Neuronal Apoptosis. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8628-y>
- Hsu, J. Y. C., Bourguignon, L. Y. W., Adams, C. M., Peyrollier, K., Zhang, H., Fandel, T., ... Noble-Haeusslein, L. J. (2008). Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2287-08.2008>
- Hsu, S. S., Jan, C. R., & Liang, W. Z. (2018). The investigation of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin (LCT)-affected Ca²⁺ homeostasis and -activated Ca²⁺ - associated mitochondrial apoptotic pathway in normal human astrocytes: The evaluation of protective effects of BAPTA-AM (a selective . *NeuroToxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.09.009>
- Huang, Y. H., Lin, Y., Mu, P., Lee, B. R., Brown, T. E., Wayman, G., ... Dong, Y. (2009). In vivo cocaine experience generates silent synapses. *Neuron*.
- Huertas, A., Wessinger, W. D., Kucheryavykh, Y. V., Sanabria, P., Eaton, M. J., Skatchkov, S. N., ... Inyushin, M. Y. (2015). Quinine enhances the behavioral stimulant effect of cocaine in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.11.021>
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn2003>
- Iino, M., Goto, K., Kakegawa, W., Okado, H., Sudo, M., Ishiuchi, S., ... Ozawa, S. (2001). Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1058827>
- Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.02.001>
- Imura, T., Nakano, I., Kornblum, H. I., & Sofroniew, M. V. (2006). Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: Differential expression of LeX/CD15 by

- GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20281>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Jang, E. Y., Ryu, Y. H., Lee, B. H., Chang, S. C., Yeo, M. J., Kim, S. H., ... Kim, H. Y. (2015). Involvement of reactive oxygen species in cocaine-taking behaviors in rats. *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/adb.12159>
- Jatiani, S. S., Baker, S. J., Silverman, L. R., & Premkumar Reddy, E. (2010). JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for targeted therapies. *Genes and Cancer*. <https://doi.org/10.1177/1947601910397187>
- Jennings, A., Tyurikova, O., Bard, L., Zheng, K., Semyanov, A., Henneberger, C., & Rusakov, D. A. (2017). Dopamine elevates and lowers astroglial Ca²⁺ through distinct pathways depending on local synaptic circuitry. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23103>
- Jia, M., Njapo, S. A. N., Rastogi, V., & Hedna, V. S. (2015). Taming glutamate excitotoxicity: Strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0225-3>
- Joffe ME, Vitter SR, Grueter BA (2017): GluN1 deletions in D1- and A2A-expressing cell types reveal distinct modes of behavioral regulation. *Neuropharmacology* 112:172–180.
- John, G. R., Lee, S. C., & Brosnan, C. F. (2003). Cytokines: Powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/1073858402239587>
- Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *Journal of Neuroscience*.
- Jones, T. A., & Greenough, W. T. (1996). Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0005>
- Jurič, D. M., Kržan, M., & Lipnik-Stangelj, M. (2016). Histamine and astrocyte function. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.035>
- Kalivas, P. W. (2007). Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: Neuro circuitry and glutamate neuroplasticity. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9(4), 389–397.
- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature Publishing Group*, 10. <https://doi.org/10.1038/nrn2515>
- Kalivas, P. W., McFarland, K., Bowers, S., Szumlinski, K., Xi, Z. X., & Baker, D. (2003). Glutamate Transmission and Addiction to Cocaine. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1196/annals.1300.009>
- Kaltschmidt, B., & Kaltschmidt, C. (2009). NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P. A., & Kaltschmidt, C. (1997). Transcription factor NF-κB is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2642>
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/3684>
- Katoozi, S., Skauli, N., Rahmani, S., Camassa, L. M. A., Boldt, H. B., Ottersen, O. P., & Amiry-Moghaddam, M. (2017). Targeted deletion of Aqp4 promotes the formation of astrocytic gap junctions. *Brain Structure and Function*. <https://doi.org/10.1007/s00429->

017-1448-5

- Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: Role in ingestive behavior and reward-related learning. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.015>
- Kettenmann, H., Backus, K. H., & Schachner, M. (1984). Aspartate, glutamate and γ -aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neuroscience Letters*.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(84\)90345-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90345-8)
- Kim, K. J., Iddings, J. A., Stern, J. E., Blanco, V. M., Croom, D., Kirov, S. A., & Filosa, J. A. (2015). Astrocyte contributions to flow/pressure-evoked parenchymal arteriole vasoconstriction. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-14.2015>
- Kimelberg, H.K. (2010). Functions of Mature Mammalian Astrocytes : A Current Review. *Neuroscientist*.
<https://doi.org/10.1177/1073858409342593>
- King, A. E., Ackley, M. A., Cass, C. E., Young, J. D., & Baldwin, S. A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.004>
- Knackstedt, L. A., Melendez, R. I., & Kalivas, P. W. (2010). Ceftriaxone Restores Glutamate Homeostasis and Prevents Relapse to Cocaine Seeking. *Biological Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.07.018>
- Koob, G. F., & Bloom, F. E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2903550>
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the Brain Antireward System. *Annual Review of Psychology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093548>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 35(10), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Koppel, I., Jaanson, K., Klasche, A., Tuvikene, J., Tiirik, T., Pärn, A., & Timmusk, T. (2018). Dopamine cross-reacts with adrenoreceptors in cortical astrocytes to induce BDNF expression, CREB signaling and morphological transformation. *GLIA*.
<https://doi.org/10.1002/glia.23238>
- Kordes, U., & Hagel, C. (2006). Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9180-7>
- Korpi, E. R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D. J., ... Dawe, G. S. (2015). Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse. *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010967>
- Koulakoff, A., Ezan, P., & Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20698>
- Kourrich, S., Rothwell, P. E., Klug, J. R., & Thomas, M. J. (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1859-07.2007>
- Koval, M. (2006). Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends in Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.01.006>
- Kraft, R. (2015). STIM and ORAI proteins in the nervous system. *Channels*.
<https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1071747>
- Kremer, M. C., Jung, C., Batelli, S., Rubin, G. M., & Gaul, U. (2017). The glia of the adult *Drosophila* nervous system. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23115>
- Kressin, K., Kuprijanova, E., Jabs, R., Seifert, G., & Steinhäuser, C. (1995). Developmental

- regulation of Na⁺ and K⁺ conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.440150210>
- Kristian Enkvist, M. O., & McCarthy, K. D. (1994). Astroglial Gap Junction Communication Is Increased by Treatment with Either Glutamate or High K⁺ Concentration. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62020489.x>
- Kuchibhotla, K. V., Lattarulo, C. R., Hyman, B. T., & Bacsikai, B. J. (2009). Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1169096>
- Kucukdereli, H., Allen, N. J., Lee, A. T., Feng, A., Ozlu, M. I., Conatser, L. M., ... Eroglu, C. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins hevin and SPARC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104977108>
- Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steinhäuser, C., Dermietzel, R., & Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990115\)25:2<111::AID-GLIA2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(19990115)25:2<111::AID-GLIA2>3.0.CO;2-I)
- Kupchik, Y. M., Brown, R. M., Heinsbroek, J. A., Lobo, M. K., Schwartz, D. J., & Kalivas, P. W. (2015). Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4068>
- Kupchik, Y. M., & Kalivas, P. W. (2017). The Direct and Indirect Pathways of the Nucleus Accumbens are not What You Think. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.160>
- Lafrenaye, A.D. & Simard, J.M. (2019). Bursting at the Seams : Molecular Mechanisms Mediating Astrocyte Swelling. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20020330>
- Lee, H. K., Takamiya, K., Han, J. S., Man, H., Kim, C. H., Rumbaugh, G., ... Huganir, R. L. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00122-3)
- Lenhossek, M. von. (1895). Der Feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen. *Berlin: Fischer's Medicinische Buchhandlung H. Kornfiel*.
- Lewitus, G. M., Konefal, S. C., Greenhalgh, A. D., Pribiag, H., Augereau, K., & Stellwagen, D. (2016). Microglial TNF- α Suppresses Cocaine-Induced Plasticity and Behavioral Sensitization. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.030>
- Li, D., Liu, N., Zhao, H. H., Zhang, X., Kawano, H., Liu, L., ... Li, H. P. (2017). Interactions between Sirt1 and MAPKs regulate astrocyte activation induced by brain injury in vitro and in vivo. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0841-6>
- Li, Xia, Peng, X. Q., Jordan, C. J., Li, J., Bi, G. H., He, Y., ... Xi, Z. X. (2018). MGluR5 antagonism inhibits cocaine reinforcement and relapse by elevation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens via a CB1 receptor mechanism. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22087-1>
- Li, Xiaodong, Zima, A. V., Sheikh, F., Blatter, L. A., & Chen, J. (2005). Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP₃)-receptor type 2-deficient mice. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000172556.05576.4c>
- Li, Z., Gao, L., Liu, Q., Cao, C., Sun, X. L., Ding, J. H., & Hu, G. (2006). Aquaporin-4 knockout regulated cocaine-induced behavior and neurochemical changes in mice. *Neuroscience*

- Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.05.004>
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C. A., Fowler, S. W., ... Zheng, H. (2015). NFκB-Activated Astroglial Release of Complement C3 Compromises Neuronal Morphology and Function Associated with Alzheimer's Disease. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.018>
- Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liebmann, M., Stahr, A., Guenther, M., Witte, O. W., & Frahm, C. (2013). Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.013>
- Lind, B. L., Brazhe, A. R., Jessen, S. B., Tan, F. C. C., & Lauritzen, M. J. (2013). Rapid stimulus-evoked astrocyte Ca²⁺ elevations and hemodynamic responses in mouse somatosensory cortex in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310065110>
- Lind, B. L., Jessen, S. B., Lønstrup, M., Joséphine, C., Bonvento, G., & Lauritzen, M. (2018). Fast Ca²⁺ responses in astrocyte end-feet and neurovascular coupling in mice. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23246>
- Liu, X., Petit, J. M., Ezan, P., Gyger, J., Magistretti, P., & Giaume, C. (2013). The psychostimulant modafinil enhances gap junctional communication in cortical astrocytes. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.019>
- Lobo MK, Covington HE, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, DamezWerno D, et al. (2010): Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* 330:385–390
- Loewenstein, W. R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.4.829>
- Losi, G., Mariotti, L., & Carmignoto, G. (2014). GABAergic interneuron to astrocyte signalling: A neglected form of cell communication in the brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0609>
- Lüscher, C., & Ungless, M. A. (2006). The mechanistic classification of addictive drugs. *PLoS Medicine*, 3(11), 2005–2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030437>
- Lutz, S. E., Zhao, Y., Gulinello, M., Lee, S. C., Raine, C. S., & Brosnan, C. F. (2009). Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0341-09.2009>
- MacAulay, N., & Zeuthen, T. (2010). Water transport between CNS compartments: Contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.016>
- MacVicar, B. A., Tse, F. W. Y., Crichton, S. A., & Kettenmann, H. (1989). GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices. *Journal of Neuroscience*.
- Madayag, A., Lobner, D., Kau, K. S., Mantsch, J. R., Abdulhameed, O., Hearing, M., ... Baker, D. A. (2007). Repeated N-acetylcysteine administration alters plasticity-dependent effects of cocaine. *Journal of Neuroscience*.

- <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2808-07.2007>
- Mai, H. N., Nguyen, L. T. T., Shin, E. J., Kim, D. J., Jeong, J. H., Chung, Y. H., ... Kim, H. C. (2019). Astrocytic mobilization of glutathione peroxidase-1 contributes to the protective potential against cocaine kindling behaviors in mice via activation of JAK2/STAT3 signaling. *Free Radical Biology and Medicine*.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.027>
- Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation - A decade of progress? *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1870>
- Manley, G. T., Zador, Z., Stiver, S., & Wang, V. (2009). Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of Experimental Pharmacology*.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_7
- Manthey, D., Banach, K., Desplantez, T., Lee, C. G., Kozak, C. A., Traub, O., ... Willecke, K. (2001). Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels. *Journal of Membrane Biology*.
<https://doi.org/10.1007/s00232-001-0017-1>
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*.
<https://doi.org/10.1038/ncpneuro00355>
- Marie, H., Morishita, W., Yu, X., Calakos, N., & Malenka, R. C. (2005). Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB. *Neuron*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.039>
- Martin, M., Chen, B. T., Hopf, F. W., Bowers, M. S., & Bonci, A. (2006). Cocaine self-administration selectively abolishes LTD in the core of the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn1713>
- Masaki, K. (2015). Early disruption of glial communication via connexin gap junction in multiple sclerosis, Baló's disease and neuromyelitis optica. *Neuropathology*.
<https://doi.org/10.1111/neup.12211>
- Masaki, K., Suzuki, S. O., Matsushita, T., Yonekawa, T., Matsuoka, T., Isobe, N., ... Kira, J. ichi. (2012). Extensive loss of connexins in Baló's disease: Evidence for an auto-antibody-independent astrocytopathy via impaired astrocyte-oligodendrocyte/myelin interaction. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0972-x>
- Mashima, K., Takahashi, S., Minami, K., Izawa, Y., Abe, T., Tsukada, N., ... Suzuki, N. (2018). Neuroprotective Role of Astroglia in Parkinson Disease by Reducing Oxidative Stress Through Dopamine-Induced Activation of Pentose-Phosphate Pathway. *ASN Neuro*.
<https://doi.org/10.1177/1759091418775562>
- Massie, A., Schallier, A., Kim, S. W., Fernando, R., Kobayashi, S., Beck, H., ... Michotte, Y. (2011). Dopaminergic neurons of system xc--deficient mice are highly protected against 6-hydroxydopamine-induced toxicity. *FASEB Journal*.
<https://doi.org/10.1096/fj.10-177212>
- Mattii, L., Pardini, C., Ippolito, C., Bianchi, F., Sabbatini, A. R. M., & Vaglini, F. (2019). Rho-inhibition and neuroprotective effect on rotenone-treated dopaminergic neurons in vitro. *NeuroToxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.006>
- Mattson, M. P., & Meffert, M. K. (2006). Roles for NF-κB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401837>
- McFarland, K., Lapish, C. C., & Kalivas, P. W. (2003). Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *Journal of Neuroscience*.

- McGregor, A., & Roberts, D. C. S. (1993). Dopaminergic antagonism within the nucleus accumbens or the amygdala produces differential effects on intravenous cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90084-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90084-Z)
- Meier, S. D., Kafitz, K. W., & Rose, C. R. (2008). Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20684>
- Mejias-Aponte, C. A., Ye, C., Bonci, A., Kiyatkin, E. A., & Morales, M. (2015). A subpopulation of neurochemically-identified ventral tegmental area dopamine neurons is excited by intravenous cocaine. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3422-13.2015>
- Même, W., Calvo, C. F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., & Giaume, C. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: Potentiation by β -amyloid. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4297fje>
- Menegas, W., Bergan, J. F., Ogawa, S. K., Isogai, Y., Venkataraju, K. U., Osten, P., ... Watabe-Uchida, M. (2015). Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically distinct subclass. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.10032>
- Merkel, S. F. (2017). *Effects of Traumatic Brain Injury on Addiction-Like Behavior and Their Neuropathological Correlates*. ProQuest Dissertations and Theses.
- Merkel, S. F., Andrews, A. M., Lutton, E. M., Razmpour, R., Cannella, L. A., & Ramirez, S. H. (2017). Dexamethasone attenuates the enhanced rewarding effects of cocaine following experimental traumatic brain injury. *Cell Transplantation*. <https://doi.org/10.1177/0963689717714341>
- Merkel, S. F., Razmpour, R., Lutton, E. M., Tallarida, C. S., Heldt, N. A., Cannella, L. A., ... Ramirez, S. H. (2017). Adolescent traumatic brain injury induces chronic mesolimbic neuroinflammation with concurrent enhancement in the rewarding effects of cocaine in mice during adulthood. *Journal of Neurotrauma*. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4275>
- Meunier, C., Wang, N., Yi, C., Dallerac, G., Ezan, P., Koulakoff, A., ... Giaume, C. (2017). Contribution of astroglial Cx43 hemichannels to the modulation of glutamatergic currents by D-serine in the mouse prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2204-16.2017>
- Meyer, J. S. (2013). Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior. *Psychopharmacology Second Edition*. <https://doi.org/10.1086/681484>
- Michna, L., Brenz Verca, M. S., Widmer, D. A. J., Chen, S., Lee, J., Rogove, J., ... Wagner, G. C. (2001). Altered sensitivity of CD81-deficient mice to neurobehavioral effects of cocaine. *Molecular Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00092-4)
- Miguéns, M., Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Torres, I., García-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2008). Glutamate and aspartate levels in the nucleus accumbens during cocaine self-administration and extinction: A time course microdialysis study. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0958-x>
- Millán, A., Arias-Montañó, J. A., Méndez, J. A., Hernández-Kelly, L. C. R., & Ortega, A. (2004). α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors signaling complexes in Bergmann glia. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.20237>
- Miller, F. D., & Gauthier, A. S. (2007). Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.019>

- Minelli, A., DeBiasi, S., Brecha, N. C., Zuccarello, L. V., & Conti, F. (1996). GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*.
- Ming, M., Li, X., Fan, X., Yang, D., Li, L., Chen, S., ... Le, W. (2009). Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: Possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease. *Journal of Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-53>
- Mitrano, D. A., Arnold, C., & Smith, Y. (2008). Subcellular and subsynaptic localization of group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens of cocaine-treated rats. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.049>
- Mizumori, S. J. Y., & Baker, P. M. (2017). The Lateral Habenula and Adaptive Behaviors. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.06.001>
- Mogenson, G. J., Jones, D. L., & Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(80\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0301-0082(80)90018-0)
- Molofsky, A. V., & Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.22836>
- Molofsky, A. V., Kelley, K. W., Tsai, H. H., Redmond, S. A., Chang, S. M., Madireddy, L., ... Rowitch, D. H. (2014). Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13161>
- Montana, V., Ni, Y., Sunjara, V., Hua, X., & Parpura, V. (2004). Vesicular Glutamate Transporter-Dependent Glutamate Release from Astrocytes. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3770-03.2004>
- Moran, M. M., McFarland, K., Melendez, R. I., Kalivas, P. W., & Seamans, J. K. (2005). Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1007-05.2005>
- Morel, L., Higashimori, H., Tolman, M., & Yang, Y. (2014). VGluT1+ Neuronal Glutamatergic signaling regulates postnatal developmental maturation of cortical protoplasmic astroglia. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-14.2014>
- Moreno, A. P., & Lau, A. F. (2007). Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.004>
- Moroni, R. F., Inverardi, F., Regondi, M. C., Pennacchio, P., & Frassoni, C. (2015). Developmental expression of Kir4.1 in astrocytes and oligodendrocytes of rat somatosensory cortex and hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.09.004>
- Muller, T., Fritschy, J. M., Grosche, J., Pratt, G. D., Mohler, H., & Kettenmann, H. (1994). Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABA(A) receptor expression in Bergmann glial cells. *Journal of Neuroscience*.
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J. P., Varela, J. A., Panatier, A., Pinson, B., Baufreton, J., ... Oliet, S. H. R. (2015). Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.3901>
- Nagy, J. I., Patel, D., Ochalski, P. A. Y., & Stelmack, G. L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: Selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junction and late developmental appearance. *Neuroscience*.

- [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00191-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00191-2)
- Nagy, James I., Li, X., Rempel, J., Stelmack, G., Patel, D., Staines, W. A., ... Rash, J. E. (2001). Connexin26 in adult rodent central nervous system: Demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.1414>
- Nakagawa, T., Yabe, T., & Schwartz, J. P. (2005). Gene expression profiles of reactive astrocytes cultured from dopamine-depleted striatum. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.03.009>
- Nambu, A. (2007). Globus pallidus internal segment. *Progress in Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60008-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60008-3)
- Nan, W., Yao, F., Li, K., Lanlan, Z., Yin, G., Du, M., & Wu, B. (2017). Fisetin regulates astrocyte migration and proliferation in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2890>
- Navarrete, M., Perea, G., de Sevilla, D. F., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E. D., & Araque, A. (2012). Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001259>
- Navarrete, M., Perea, G., Maglio, L., Pastor, J., García De Sola, R., & Araque, A. (2013). Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs122>
- Neary, J. T., & Zimmermann, H. (2009). Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.01.002>
- Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.8134839>
- Nicchia, G. P., Srinivas, M., Li, W., Brosnan, C. F., Frigeri, A., & Spray, D. C. (2005). New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: Cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3281fje>
- Nicholls, D., & Attwell, D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in Pharmacological Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90129-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90129-V)
- Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., & Ottersen, O. R. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: High-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience*.
- Nimmerjahn, A., Mukamel, E. A., & Schnitzer, M. J. (2009). Motor Behavior Activates Bergmann Glial Networks. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.019>
- Nizar, K., Uhlirova, H., Tian, P., Saisan, P. A., Cheng, Q., Reznichenko, L., ... Devor, A. (2013). In vivo stimulus-induced vasodilation occurs without IP₃ receptor activation and may precede astrocytic calcium increase. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3285-12.2013>
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., ... Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(20010101\)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1136(20010101)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A)
- Norenberg, M. D., & Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90071-4)
- Norton, W. T., Aquino, D. A., Hozumi, I., Chiu, F. C., & Brosnan, C. F. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: A review. *Neurochemical Research*.

- <https://doi.org/10.1007/BF00993263>
- Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial-specific Kir_{4.1} in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1553-1>
- O'Sullivan, S. J., Malahias, E., Park, J., Srivastava, A., Reyes, B. A. S., Gorky, J., ... Schwaber, J. S. (2019). Single-cell glia and neuron gene expression in the central amygdala in opioid withdrawal suggests inflammation with correlated gut dysbiosis. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00665>
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., ... Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. *Methods of Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Ogata, K., & Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00041-6)
- Oikonomou, G., & Shaham, S. (2011). The glia of caenorhabditis elegans. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.21084>
- Oliet, S. H. R., Piet, R., & Poulain, D. A. (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1059162>
- Oliva, I., Fernández, M., & Martín, E. D. (2013). Dopamine release regulation by astrocytes during cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.007>
- Oliva, I., & Wanat, M. J. (2016). Ventral tegmental area afferents and drug-dependent behaviors. *Frontiers in Psychiatry*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00030>
- Olude, M.A., Mustapha, O.A., Aderounmu, O.A., Olopade, J.O., Ihunwo, A.O. (2015). Astrocyte Morphology, Heterogeneity and Density in the Developing African Giant Rat. *Frontiers in Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00067>
- Olsen, M. (2012). Examining potassium channel function in astrocytes. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_18
- Omrani, A., Melone, M., Bellesi, M., Safiulina, V., Aida, T., Tanaka, K., ... Conti, F. (2009). Up-regulation of GLT-1 severely impairs LTD at mossy fibre-CA₃ synapses. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.177881>
- Orellana, J. A., Hernández, D. E., Ezan, P., Velarde, V., Bennett, M. V. L., Giaume, C., & Sáez, J. C. (2010). Hypoxia in high glucose followed by reoxygenation in normal glucose reduces the viability of cortical astrocytes through increased permeability of connexin 43 hemichannels. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20926>
- Ormel, L., Stensrud, M. J., Bergersen, L. H., & Gundersen, V. (2012). VGLUT1 is localized in astrocytic processes in several brain regions. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.21258>
- Ormel, L., Stensrud, M. J., Chaudhry, F. A., & Gundersen, V. (2012). A distinct set of synaptic-like microvesicles in atrogial cells contain VGLUT3. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.22348>
- Ortolano, S., Di Pasquale, G., Crispino, G., Anselmi, F., Mammano, F., & Chiorini, J. A. (2008). Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and

- functional level in the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800831105>
- Ostroff, L. E., Manzur, M. K., Cain, C. K., & Ledoux, J. E. (2014). Synapses lacking astrocyte appear in the amygdala during consolidation of pavlovian threat conditioning. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.23523>
- Ottestad-Hansen, S., Hu, Q. X., Follin-Arbelet, V. V., Bentea, E., Sato, H., Massie, A., ... Danbolt, N. C. (2018). The cystine-glutamate exchanger (xCT, Slc7a11) is expressed in significant concentrations in a subpopulation of astrocytes in the mouse brain. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23294>
- Oyamada, M., Takebe, K., & Oyamada, Y. (2013). Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.031>
- Öz, G., Berkich, D. A., Henry, P. G., Xu, Y., LaNoue, K., Hutson, S. M., & Gruetter, R. (2004). Neuroglial metabolism in the awake rat brain: CO₂ fixation increases with brain activity. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3564-04.2004>
- Ozog, M. A., Bernier, S. M., Bates, D. C., Chatterjee, B., Lo, C. W., & Naus, C. C. G. (2004). The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor α up-regulates connexin₄₃ and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-03-0271>
- Palacios-Prado, N., & Bukauskas, F. F. (2009). Heterotypic gap junction channels as voltage-sensitive valves for intercellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901923106>
- Palygin, O., Lalo, U., Verkhratsky, A., & Pankratov, Y. (2010). Ionotropic NMDA and P2X_{1/5} receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium*. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.004>
- Panatier, A., & Robitaille, R. (2016). Astrocytic mGluR₅ and the tripartite synapse. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.063>
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaillie, J. C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>
- Pannasch, U., Dossi, E., Ezan, P., & Rouach, N. (2019). Astroglial Cx30 sustains neuronal population bursts independently of gap-junction mediated biochemical coupling. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23591>
- Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., ... Rouach, N. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nature Neuroscience*, 17(4), 549–561.
- Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., ... Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016650108>
- Papouin, T., Dunphy, J., Tolman, M., Foley, J. C., & Haydon, P. G. (2017). Astrocytic control of synaptic function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0154>
- Pardo-Garcia TR, Garcia-Keller C, Penaloza T, Richie CT, Pickel J, Hope BT, et al. (2019): Ventral pallidum is the primary target for accumbens D₁ projections driving cocaine seeking. *J Neurosci* 39:2041–2051.

- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., & Haydon, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/369744a0>
- Parpura, V., Fang, Y., Basarsky, T., Jahn, R., & Haydon, P. G. (1995). Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01401-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01401-2)
- Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.008>
- Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., & Lüscher, C. (2014). Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse.
<https://doi.org/10.1038/nature13257>
- Pascoli V, Turiault M, Lüscher C (2012): Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481:71–75
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J. Y., ... Haydon, P. G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1116916>
- Peakman, M. -C, & Hill, S. J. (1995). Adenosine A1 receptor-mediated changes in basal and histamine-stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15004.x>
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *GLIA*.
<https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A. K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Magistretti, P. J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20528>
- Pendyam, S., Mohan, A., Kalivas, P. W., & Nair, S. S. (2009). Computational model of extracellular glutamate in the nucleus accumbens incorporates neuroadaptations by chronic cocaine. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.11.014>
- Perez-Nievas, B. G., & Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00114>
- Petravicz, J., Boyt, K. M., & McCarthy, K. D. (2014). Astrocyte IP₃R₂-dependent Ca²⁺ signaling is not a major modulator of neuronal pathways governing behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00384>
- Petravicz, J., Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2008). Loss of IP₃ receptor-dependent Ca²⁺ increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5572-07.2008>
- Petrelli, F., Dallérac, G., Pucci, L., Cali, C., Zehnder, T., Sultan, S., ... Bezzi, P. (2018). Dysfunction of homeostatic control of dopamine by astrocytes in the developing prefrontal cortex leads to cognitive impairments. *Molecular Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0226-y>
- Pierozan, P., Ferreira, F., Ortiz de Lima, B., Gonçalves Fernandes, C., Totarelli Monteforte, P., De Castro Medaglia, N., ... Pessoa-Pureur, R. (2014). The phosphorylation status and cytoskeletal remodeling of striatal astrocytes treated with quinolinic acid. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.024>
- Piper, M. E. (2015). Withdrawal: Expanding a key addiction construct. *Nicotine and Tobacco*

- Research. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntvo48>
- Pirici, I., Balsanu, T. A., Bogdan, C., Margaritescu, C., Divan, T., Vitalie, V., ... Muresanu, D. F. (2018). Inhibition of aquaporin-4 improves the outcome of ischaemic stroke and modulates brain paravascular drainage pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19010046>
- Planeta, C. S. (2013). Animal models of alcohol and drug dependence. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1149>
- Ponsaerts, R., De Vuyst, E., Retamal, M., D'Hondt, C., Vermeire, D., Wang, N., ... Bultynck, G. (2010). Intramolecular loop/tail interactions are essential for connexin 43-hemichannel activity. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.09-153007>
- Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1995). GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.440130204>
- Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *Journal of Neuroscience*.
- Poskanzer, K. E., & Yuste, R. (2011). Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112378108>
- Potokar, M., Jorgačevski, J., & Zorec, R. (2016). Astrocyte aquaporin dynamics in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17071121>
- Princen, F. (2001). Rat gap junction connexin-30 inhibits proliferation of glioma cell lines. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.3.507>
- Qu, C., Gardner, P., & Schrijver, I. (2009). The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by Connexin 30. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.001>
- Quesseveur, G., Gardier, A., & Guiard, B. (2013). The Monoaminergic Tripartite Synapse: A Putative Target for Currently Available Antidepressant Drugs. *Current Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990209>
- Quintero, G. C. (2013). Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. <https://doi.org/10.2147/NDT.S45963>
- Ramakers, G.J. & Moolenaar, W.H. (1998). Regulation of Astrocyte Morphology by RhoA and Lysophosphatidic Acid. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4224>
- Rampon, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y. P., Lockhart, D. J., Schultz, P. G., ... Hu, Y. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12880>
- Ransom, C. B., Ransom, B. R., & Sontheimer, H. (2000). Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: The role of glial and axonal Na⁺ pumps. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00427.x>
- Ravizza, T., Rizzi, M., Perego, C., Richichi, C., Velísková, J., Moshé, S. L., ... Vezzani, A. (2005). Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. In *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.01006.x>
- Retamal, M. A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Sáez, P. J., Sáez, J. C., & Giaume, C. (2007). Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated

- oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2042-07.2007>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2001.9611038.x>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2003). Key Words sensitization, learning, nucleus accumbens, dopamine, drug abuse. *Most*. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.54.101601.145237>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2008). The incentive sensitization theory of addiction: Some current issues. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0093>
- Robinson, T. E., & Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.025>
- Ron, D., & Janak, P. H. (2005). GDNF and addiction. *Reviews in the Neurosciences*. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2005.16.4.277>
- Rose, C. R., & Ransom, B. R. (1996). Mechanisms of H⁺ and Na⁺ changes induced by glutamate, kainate, and D- aspartate in rat hippocampal astrocytes. *Journal of Neuroscience*.
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., ... Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80086-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80086-0)
- Rouach, N, Avignone, E., Mème, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., & Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell*, 94(7–8), 457–475.
- Rouach, Nathalie, Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., & Giaume, C. (2008). Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science*, 322(5907), 1551–1555.
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G., & Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107386108>
- Rusakov, D. A. (2015). Disentangling calcium-driven astrocyte physiology. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3878>
- Russo, S. J., Dietz, D. M., Dumitriu, D., Morrison, J. H., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2010). The addicted synapse: Mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.002>
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>
- Saba, J., Turati, J., Ramírez, D., Carniglia, L., Durand, D., Lasaga, M., & Caruso, C. (2018). Astrocyte truncated tropomyosin receptor kinase B mediates brain-derived neurotrophic factor anti-apoptotic effect leading to neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.14476>
- Saba, R., Storchel, P. H., Aksoy-Aksel, A., Kepura, F., Lippi, G., Plant, T. D., & Schratz, G. M. (2012). Dopamine-Regulated MicroRNA MiR-181a Controls GluA2 Surface Expression in Hippocampal Neurons. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.05896-11>
- Saddoris, M. P., Cacciapaglia, F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2015). Differential dopamine release dynamics in the nucleus accumbens core and shell reveal

- complementary signals for error prediction and incentive motivation. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2344-15.2015>
- Saddoris, M. P., Sugam, J. A., Cacciapaglia, F., & Carelli, R. M. (2013). Rapid dopamine dynamics in the accumbens core and shell: Learning and action. *Frontiers in Bioscience - Elite*.
- Sadigh-Eteghad, S., Majdi, A., Mahmoudi, J., Golzari, S. E. J., & Talebi, M. (2016). Astrocytic and microglial nicotinic acetylcholine receptors: an overlooked issue in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1580-z>
- Salery, M., Trifilieff, P., Caboche, J. & Vanhoutte P. (2019) From Signaling Molecules to Circuits and Behaviors: Cell-Type–Specific Adaptations to Psychostimulant Exposure in the Striatum. *Biological Psychiatry*
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.11.001>
- Salman, M. M., Kitchen, P., Woodroffe, M. N., Brown, J. E., Bill, R. M., Conner, A. C., & Conner, M. T. (2017). Hypothermia increases aquaporin 4 (AQP4) plasma membrane abundance in human primary cortical astrocytes via a calcium/transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)- and calmodulin-mediated mechanism. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.13723>
- Santello, M., Cali, C., & Bezzi, P. (2012). Gliotransmission and the tripartite synapse. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_14
- Sasaki, T., Ishikawa, T., Abe, R., Nakayama, R., Asada, A., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2014). Astrocyte calcium signalling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272864>
- Scemes, E., & Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20374>
- Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., & Kirchhoff, F. (2001). Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0439fje>
- Schneider, G. H., Baethmann, A., & Kempster, O. (1992). Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1139/y92-280>
- Schneider, R., Santos, C. F., Clarimundo, V., Dalmaz, C., Elisabetsky, E., & Gomez, R. (2015). N-acetylcysteine prevents behavioral and biochemical changes induced by alcohol cessation in rats. *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.01.009>
- Schools, G. P., Zhou, M., & Kimelberg, H. K. (2006). Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: Evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *Journal of Neurophysiology*.
<https://doi.org/10.1152/jn.00449.2006>
- Schummers, J., Yu, H., & Sur, M. (2008). Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1156120>
- Schütz, M., Scimemi, P., Majumder, P., de Sisti, R. D., Crispino, G., Rodriguez, L., ... Mammano, F. (2010). The human deafness-associated connexin 30 T5M mutation causes mild hearing loss and reduces biochemical coupling among cochlear non-sensory cells in knock-in mice. *Human Molecular Genetics*.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddq402>

- Schwartz, B. G., Rezkalla, S., & Kloner, R. A. (2010). Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine Cardiovascular Effects of Cocaine, 2558–2569. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.940569>
- Scofield, M. D. (2018). Exploring the Role of Astroglial Glutamate Release and Association With Synapses in Neuronal Function and Behavior. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.029>
- Scofield, M. D., Li, H., Siemsen, B. M., Healey, K. L., Tran, P. K., Woronoff, N., ... Reissner, K. J. (2016). Cocaine Self-Administration and Extinction Leads to Reduced Glial Fibrillary Acidic Protein Expression and Morphometric Features of Astrocytes in the Nucleus Accumbens Core. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.12.022>
- Segretain, D., & Falk, M. M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.01.007>
- Seifert, G., Hüttmann, K., Binder, D. K., Hartmann, C., Wyczynski, A., Neusch, C., & Steinhäuser, C. (2009). Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3790-08.2009>
- Sekar, S., McDonald, J., Cuyugan, L., Aldrich, J., Kurdoglu, A., Adkins, J., ... Liang, W. S. (2015). Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiology of Aging*. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.027>
- Shao, W., Zhang, S. Z., Tang, M., Zhang, X. H., Zhou, Z., Yin, Y. Q., ... Zhou, J. W. (2013). Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D₂ receptors via α -crystallin. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11748>
- Shen, H. W., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, A., Zahm, D. S., & Kalivas, P. W. (2009). Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5638-08.2009>
- Sherwood, C. C., Stimpson, C. D., Raghanti, M. A., Wildman, D. E., Uddin, M., Grossman, L. I., ... Hof, P. R. (2006). Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605843103>
- Sherwood, M. W., Arizono, M., Hisatsune, C., Bannai, H., Ebisui, E., Sherwood, J. L., ... Mikoshiba, K. (2017). Astrocytic IP₃Rs: Contribution to Ca²⁺ signalling and hippocampal LTP. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23107>
- Shibasaki, K., Hosoi, N., Kaneko, R., Tominaga, M., & Yamada, K. (2017). Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.13741>
- Shigetomi, E., Kracun, S., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2010). A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2557>
- Shimamoto, A., Rappeneau, V., Munjal, H., Farris, T., Davis, C., Wilson, A., ... Meshul, C. K. (2018). Glutamate-Glutamine Transfer and Chronic Stress-Induced Sex Differences in Cocaine Responses. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.09.009>
- Shin, Y. J., Kim, H. L., Park, J. M., Cho, J. M., Kim, S. Y., & Lee, M. Y. (2013). Characterization of nestin expression and vessel association in the ischemic core following focal cerebral ischemia in rats. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1538-x>

- Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C., & Koizumi, S. (2014). Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srepo4329>
- Shinozaki, Y., Shibata, K., Yoshida, K., Shigetomi, E., Gachet, C., Ikenaka, K., ... Koizumi, S. (2017). Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.047>
- Shuster, L., Yu, G., & Bates, A. (1977). Sensitization to cocaine stimulation in mice. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/BF00439108>
- Siemsen, B. M., Reichel, C. M., Leong, K. C., Garcia-Keller, C., Gipson, C. D., Spencer, S., ... Scofield, M. D. (2019). Effects of Methamphetamine Self-Administration and Extinction on Astrocyte Structure and Function in the Nucleus Accumbens Core. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.040>
- Silver, J., & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn1326>
- Simansky, K. J., Bourbonnais, K. A., & Smith, G. P. (1985). Food-related stimuli increase the ratio of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid to dopamine in the hypothalamus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(85\)90566-0](https://doi.org/10.1016/0091-3057(85)90566-0)
- Simard, M., & Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.053>
- Singh-Bains, M. K., Waldvogel, H. J., & Faull, R. L. M. (2016). The role of the human globus pallidus in Huntington's disease. *Brain Pathology*. <https://doi.org/10.1111/bpa.12429>
- Singh, A. V., Raymond, M., Pace, F., Certo, A., Zuidema, J. M., McKay, C. A., ... Wan, L. Q. (2015). Astrocytes increase ATP exocytosis mediated calcium signaling in response to microgroove structures. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srepo7847>
- Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Zielińska, M., & Albrecht, J. (2019). NMDA receptors in astrocytes: In search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20020309>
- Smith, G. P., Bourbonnais, K. A., Jerome, C., & Simansky, K. J. (1987). Sham feeding of sucrose increases the ratio of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid to dopamine in the hypothalamus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90170-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(87)90170-5)
- Smith, W. B., Starck, S. R., Roberts, R. W., & Schuman, E. M. (2005). Dopaminergic stimulation of local protein synthesis enhances surface expression of GluR1 and synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.015>
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- Sofroniew, M. V. (2014). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/1073858413504466>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Špaček, J. (1985). Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses - A serial section study. *Anatomy and Embryology*. <https://doi.org/10.1007/BF00707311>

- Srinivasan, R., Huang, B. S., Venugopal, S., Johnston, A. D., Chai, H., Zeng, H., ... Khakh, B. S. (2015). Ca²⁺ signaling in astrocytes from *Ip3r2*^{-/-} mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4001>
- Stogsdill, J. A., Ramirez, J., Liu, D., ... Eroglu, C. (2017). Astrocytic Neuroligins Control Astrocyte Morphogenesis and Synaptogenesis. *Nature* <https://doi.org/10.1038/nature24638>
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverría, C., Orellana, J. A., ... Retamal, M. A. (2012). Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.11-198416>
- Steketee, J. D., & Kalivas, P. W. (2011). Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 348–365. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- Stella, N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20983>
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., ... Barres, B. A. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>
- Stobart, J. L., Ferrari, K. D., Barrett, M. J. P., Glück, C., Stobart, M. J., Zuend, M., & Weber, B. (2018). Cortical Circuit Activity Evokes Rapid Astrocyte Calcium Signals on a Similar Timescale to Neurons. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.050>
- Subramanian, K., Brandenburg, C., Orsati, F., Soghomonian, J. J., Hussman, J. P., & Blatt, G. J. (2017). Basal ganglia and autism – a translational perspective. *Autism Research*. <https://doi.org/10.1002/aur.1837>
- Sulzer, D. (2011). How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine Neurotransmission. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>
- Sun, W., McConnell, E., Pare, J. F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., ... Nedergaard, M. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1226740>
- Swanson, L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90145-9)
- Swanson, R., Ying, W., & Kauppinen, T. (2005). Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death. *Current Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.2174/1566524043479185>
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., & Hirase, H. (2011). Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-11.2011>
- Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., ... Lüscher, C. (2012). GABA Neurons of the VTA Drive Conditioned Place Aversion. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.015>
- Testen, A., Sepulveda-Orengo, M. T., Gaines, C. H., & Reissner, K. J. (2018). Region-specific reductions in morphometric properties and synaptic colocalization of astrocytes following cocaine self-administration and extinction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00246>
- Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Döring, B., ... Willecke, K. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in

- mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-03-00766.2003>
- Thomas, M. J., Beurrier, C., Bonci, A., & Malenka, R. C. (2001). Long-term depression in the nucleus accumbens : a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine, 1217–1223. <https://doi.org/10.1038/nn757>
- Todd, A. C., Marx, M. C., Hulme, S. R., Bröer, S., & Billups, B. (2017). SNAT3-mediated glutamine transport in perisynaptic astrocytes in situ is regulated by intracellular sodium. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23133>
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Haustein, M. D., ... Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nature Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nn.3691>
- Tura, A., Schuettauf, F., Monnier, P. P., Bartz-Schmidt, K. U., & Henke-Fahle, S. (2009). Efficacy of Rho-kinase inhibition in promoting cell survival and reducing reactive gliosis in the rodent retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
<https://doi.org/10.1167/iovs.08-1973>
- Umpierre, A. D., West, P. J., White, J. A., & Wilcox, K. S. (2019). Conditional knock-out of mGluR5 from astrocytes during epilepsy development impairs high-frequency glutamate uptake. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1148-18.2018>
- Urayama, S., Semi, K., Sanosaka, T., Hori, Y., Namihira, M., Kohyama, J., ... Nakashima, K. (2013). Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation. *Cell Structure and Function*. <https://doi.org/10.1247/csf.12034>
- Usuda, I., Tanaka, K., & Chiba, T. (1998). Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: Biotinylated dextran amine study. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00359-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00359-X)
- Van der Heyden, M. A. G., Rook, M. B., Hermans, M. M. P., Rijksen, G., Boonstra, J., Deflze, L. H. K., & Destrée, O. H. J. (1998). Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *Journal of Cell Science*.
- Van Zessen, R., Phillips, J. L., Budygin, E. A., & Stuber, G. D. (2012). Activation of VTA GABA Neurons Disrupts Reward Consumption. *Neuron*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.016>
- Vandenberg, R. J., & Ryan, R. M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2013>
- Vanderschuren, L. J. M. J., & Pierce, R. C. (2010). Sensitization processes in drug addiction. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. https://doi.org/10.1007/7854_2009_21
- Vasile, F., Dossi, E., Rouach, N. (2017) Human Astrocytes: Structure and Functions in the Healthy Brain. *Brain Structure and Function*
<https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- Vazquez-Derose, J., Stauber, G., Khroyan, T. V., Xie, X. S., Zaveri, N. T., & Toll, L. (2013). Retrodialysis of N/OFQ into the nucleus accumbens shell blocks cocaine-induced increases in extracellular dopamine and locomotor activity. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.050>
- Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *Journal of Neuroscience*.
- Verkhratsky, Alexei, & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

- Verkhatsky, Alexei, Reyes, R. C., & Parpura, V. (2014). TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. https://doi.org/10.1007/112_2013_15
- Verkhatsky, Alexei, Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., & Zorec, R. (2017). Astroglial calcium signalling in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.088>
- Verkhatsky, Alexei, Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2012). Neurotransmitters and integration in neuronal-astroglial networks. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0765-6>
- Verkhatsky, Alexej, & Steinhäuser, C. (2000). Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00093-4)
- Vlachaki Walker, J. M., Robb, J. L., Cruz, A. M., Malhi, A., Weightman Potter, P. G., Ashford, M. L. J., ... Beall, C. (2017). AMP-activated protein kinase (AMPK) activator A-769662 increases intracellular calcium and ATP release from astrocytes in an AMPK-independent manner. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. <https://doi.org/10.1111/dom.12912>
- Volkow, N. D. (2000). Addiction, a Disease of Compulsion and Drive: Involvement of the Orbitofrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 10(3), 318–325. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.318>
- Volkow, Nora D., Fowler, J. S., & Wang, G. (2003). The Addicted Human Brain: Insights from Imaging Studies Find the Latest Version: The Addicted Human Brain: Insights from Imaging Studies. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1444–1451. <https://doi.org/10.1172/JCI200318533.Imaging>
- Volkow, Nora D., & Li, T.-K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 963–970. <https://doi.org/10.1038/nrn1539>
- Vollbrecht, P. J., Simmler, L. D., Blakely, R. D., & Deutch, A. Y. (2014). Dopamine denervation of the prefrontal cortex increases expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.12697>
- Wall, N. R., DeLaParra, M., Callaway, E. M., & Kreitzer, A. C. (2013). Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.014>
- Wang, N., De Bock, M., Decrock, E., Bol, M., Gadicherla, A., Vinken, M., ... Leybaert, L. (2013). Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.002>
- Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G. Y., & Sun, A. Y. (2005). Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. In *Molecular Neurobiology*.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G. F., Peng, W. G., Han, X., ... Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn1703>
- Wang, Z., Tymianski, M., Jones, O. T., & Nedergaard, M. (1997). Impact of cytoplasmic calcium buffering on the spatial and temporal characteristics of intercellular calcium signals in astrocytes. *Journal of Neuroscience*.
- Waniewski, R. A., & Martin, D. L. (1986). Exogenous Glutamate Is Metabolized to Glutamine and Exported by Rat Primary Astrocyte Cultures. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb02863.x>
- Wanner, I. B., Anderson, M. A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., ... Sofroniew, M. V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated

- astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>
- Wanner, I. B., Deik, A., Torres, M., Rosendahl, A., Neary, J. T., Lemmon, V. P., & Bixby, J. L. (2008). A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *GLIA*.
<https://doi.org/10.1002/glia.20721>
- Weissenborn, R., Deroche, V., Koob, G. F., & Weiss, F. (1996). Effects of dopamine agonists and antagonists on cocaine-induced operant responding for a cocaine-associated stimulus. *Psychopharmacology*.
- Wen, F., Liu, L., Xu, Z., Yang, J., & Ding, S. (2017). [Dopamine inhibits glutamate-uptake ability of astrocytes via TAAR1-EAAT2 pathway]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi = Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*.
- Wenzel, J., Lammert, G., Meyer, U., & Krug, M. (1991). The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. *Brain Research*.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91222-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91222-M)
- Wilhelmsson, U., Andersson, D., De Pablo, Y., Pekny, R., Ståhlberg, A., Mulder, J., ... Pekna, M. (2017). Injury Leads to the Appearance of Cells with Characteristics of Both Microglia and Astrocytes in Mouse and Human Brain. *Cerebral Cortex*.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhx069>
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., ... Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602841103>
- Winship, I. R., Plaa, N., & Murphy, T. H. (2007). Rapid astrocyte calcium signals correlate with neuronal activity and onset of the hemodynamic response in vivo. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4801-06.2007>
- Wise, R. A., & Bozarth, M. A. (1987). A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. *Psychological Review*. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.94.4.469>
- Wise, R. A., & Koob, G. F. (2014). The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 39(2), 254–262. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>
- Wolf, M. E. (2011). The Bermuda Triangle of Cocaine-Induced Neuroadaptations Marina, 33(9), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.06.003>.The
- Wolf, M. E., Mangiavacchi, S., & Sun, X. (2003). Mechanisms by which Dopamine Receptors May Influence Synaptic Plasticity. In *Annals of the New York Academy of Sciences*.
<https://doi.org/10.1196/annals.1300.015>
- Wolff, J. R., Stuke, K., Missler, M., Tytko, H., Schwarz, P., Rohlmann, A., & Chao, T. I. (1998). Autocellular coupling by gap junctions in cultured astrocytes: A new view on cellular autoregulation during process formation. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199809\)24:1<121::AID-GLIA12>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199809)24:1<121::AID-GLIA12>3.0.CO;2-T)
- Woo, D. H., Han, K. S., Shim, J. W., Yoon, B. E., Kim, E., Bae, J. Y., ... Lee, C. J. (2012). TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell*.
- Wu, X. M., Qian, C., Zhou, Y. F., Yan, Y. C., Luo, Q. Q., Yung, W. H., ... Ke, Y. (2017). Bi-directionally protective communication between neurons and astrocytes under ischemia. *Redox Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.010>
- Xi, Z. X., Ramamoorthy, S., Baker, D. A., Shen, H., Samuvel, D. J., & Kalivas, P. W. (2002).

- Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
<https://doi.org/10.1124/jpet.102.039735>
- Xu-Friedman, M. A., & Regehr, W. G. (2003). Ultrastructural contributions to desensitization at cerebellar mossy fiber to granule cell synapses. *Journal of Neuroscience*.
- Yager LM, Garcia AF, Donckels EA, Ferguson SM (2019): Chemogenetic inhibition of direct pathway striatal neurons normalizes pathological, cue-induced reinstatement of drug-seeking in rats. *Addict Biol* 24:251–264
- Yalachkov, Y., Kaiser, J., & Naumer, M. J. (2009). Brain regions related to tool use and action knowledge reflect nicotine dependence. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4891-08.2009>
- Yang, Y., Wang, H., Hu, J., & Hu, H. (2018). Lateral habenula in the pathophysiology of depression. *Current Opinion in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.024>
- Ye, B., Shen, H., Zhang, J., Zhu, Y. G., Ransom, B. R., Chen, X. C., & Ye, Z. C. (2015). Dual pathways mediate β -amyloid stimulated glutathione release from astrocytes. *GLIA*.
<https://doi.org/10.1002/glia.22886>
- Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., & Ransom, B. R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: A novel mechanism of glutamate release. *Journal of Neuroscience*, 23(9), 3588–3596. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-09-03588.2003>
- Zahm, D. S., & Brog, J. S. (1992). On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90202-D](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90202-D)
- Zahm, Daniel S. (n.d.). Functional-anatomical Implications of the Nucleus Accumbens Core and Shell Subterritories.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zeng, X. N., Sun, X. L., Gao, L., Fan, Y., Ding, J. H., & Hu, G. (2007). Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.09.008>
- Zhang, J., Griemsmann, S., Wu, Z., Dobrowolski, R., Willecke, K., Theis, M., ... Bedner, P. (2018). Connexin43, but not connexin30, contributes to adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Brain Research Bulletin*.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.001>
- Zhang, Yan, Xue, Y., Meng, S., Luo, Y., Liang, J., Li, J., ... Shi, J. (2016). Inhibition of Lactate Transport Erases Drug Memory and Prevents Drug Relapse. *Biological Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.007>
- Zhang, Ye, Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keeffe, S., ... Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zheng, K., Bard, L., Reynolds, J. P., King, C., Jensen, T. P., Gourine, A. V., & Rusakov, D. A. (2015). Time-Resolved Imaging Reveals Heterogeneous Landscapes of Nanomolar Ca²⁺ in Neurons and Astroglia. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.043>
- Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>
- Zhu, R., Bu, Q., Fu, D., Shao, X., Jiang, L., Guo, W., ... Cen, X. (2018). Toll-like receptor 3

- modulates the behavioral effects of cocaine in mice. *Journal of Neuroinflammation*.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1130-8>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
- Zou, Z., Wang, H., d'Oleire Uquillas, F., Wang, X., Ding, J., & Chen, H. (2017). Definition of substance and non-substance addiction. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5562-1_2

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier Nathalie Rouach. Nathalie, je suis venue passer l'entretien pour faire mon stage de master + la thèse dans ton équipe, un peu perdue et dépassée par les événements, et surtout sans comprendre réellement dans quoi j'embarquais. Pour une raison que j'ignore tu as quand même choisi de me faire confiance pour entreprendre ce projet au sein de ton équipe. Déjà de ça, j'aimerais t'en remercier sincèrement. Ensuite, nous n'avons pas beaucoup interagi. D'abord parce que tu étais à Cambridge lors de mon master, ensuite parce que Jonathan était mon premier interlocuteur, et enfin parce que je n'osais pas. Après ton retour, et le départ de Jonathan, nous avons eu du mal à trouver une bonne modalité de communication, principalement de ma faute. Tu ne m'as pas abandonnée, tu ne m'as pas laissée seule face à moi-même, et tes efforts ont fini par payer, et percer ma coquille. Grâce à ta persistance, j'ai beaucoup évolué sur ce point, et tu es une des principales raisons pour laquelle je peux dire que je ne suis pas la même personne aujourd'hui que je ne l'étais avant la thèse, j'ai mûri. Merci.

J'aimerais remercier les membres du jury car la rédaction n'a pas été un long chemin tranquille et malgré les surprises d'emplois du temps, ils ont répondu présents, merci.

Ensuite, je dois remercier Jonathan. Tu m'a fais confiance aussi, tu étais là pour moi. Tu as été un encadrant, puis un ami, un confident, un grand frère. Tu m'as épaulée mais tu m'as aussi poussée à être autonome, et même si ton départ a été difficile, tu m'avais bien formée pour y survivre. Merci Jojo.

Flora et Noémie, vous êtes très rapidement devenues des amies proches. Assez proches pour qu'on décide de passer aussi nos vacances ensemble, en plus des journées de boulot, ça en dit long ! Vous avoir comme voisines de bureau, c'était une raison suffisante de vouloir venir au travail tous les jours. Vivre cette thèse à vos côtés, c'était tout simplement beaucoup plus agréable, et si j'écris ces mots aujourd'hui, c'est en partie grâce à vous. Merci infiniment.

Vanessa et Sonia, pas loin derrière, normal c'est la team Portugal 2017. Je ne sais quoi dire d'autre sinon que j'aimais trop vous voir régulièrement, aux soirées, événements ou tout simplement dans la cour. Vanessa, tu étais souvent la première personne que je voyais le matin, fumant sur les escaliers, et ça me donnait toujours le sourire. Sonia, je regardais toujours par le hublot de ta porte en allant à l'animalerie, voir si t'étais là, dispo, et si on pouvait discuter 5 minutes, se montrer nos photos/vidéos de chats respectives. Bref, merci pour votre amitié.

Giselle and Danijela (yes I decided to group you both, since apparently I decided to write this part with duos and I can't think of a more iconic duo than yours), I miss you both SO MUCH. You girls embody the perfect coworker/friend. You were always willing to put your work on hold to help any of us no matter how long it took. Giselle, my almost birthday twin, I can't describe how much warmth and joy you brought to my life in the lab and to the lab generally speaking. But I'm just so happy to have met you and I will cherish the memories of the trip we did last February with the girls to visit you in Vienna (along with all of the other memories). Danijela, I just need to see you when I come to the lab. You were

my first lab roommate and you were my anchor. I came to Serbia to visit you ! That was epic. I will always think of you when eating M&M's now and your departure was probably the most heartbreaking one for me. Thank you girls so much for all these memories and for just being you.

J'aimerais ensuite tout particulièrement remercier les personnes qui ont permis de redonner un second souffle à mon travail quand il m'épuisait. Armelle, tu es arrivée telle une chevalière sur son cheval blanc avec tes talents incroyables de patch. En plus de tes talents, tu as apporté un œil neuf et un enthousiasme très personnel au projet. Merci pour ça.

Eléonore, merci pour tes données de surexpression haha. Non plus sincèrement, le projet réactivité était compliqué à gérer seule et je suis bien contente que tu te sois rajoutée à l'équipe, pas seulement pour des aspects pratiques mais aussi parce que j'ai adoré travailler avec toi. Et en plus tu faisais du zèle en étant très présente lors des sessions patch avec Armelle. Alors merci à toi et merci à vous.

Enfin David, je suis aussi très contente d'avoir pu partagé plusieurs projets avec toi, la revue, le projet calcium, et même la cocaïne. Tu donnais la cadence et ton efficacité m'impressionne. Merci beaucoup.

Ensuite, j'aimerais remercier toutes les personnes de cette grande équipe individuellement, mais nous sommes nombreux... et je tiens tout de même à vous remercier individuellement car je n'ai pas de limites de pages alors je vais le faire.

Pascal, comment tu fais ? Non mais vraiment, j'admire ton professionnalisme, ta capacité à tout faire et à être partout tout le temps, mais surtout ton tempérament si apaisant. Je suis très contente d'avoir pu partager ton bureau.

En parlant de voisin de bureau, merci Charles, de ton naturel, ton humour, et tes piqûres de rappel sur la réalité, qui permettaient de nous remettre les pieds sur terre de temps à autre.

Noémie C., c'était trop cool de t'avoir aussi dans le bureau et tu y as apporté une fraîcheur quotidienne toujours bienvenue.

Giampaolo, une arrivée tardive dans le bureau, tu y as rapidement pris ta place et je suis trop contente de te connaître car on se marre bien et que je me sens moins seule quand je fais des boulettes.

Elena, en tant qu'ancienne de cette équipe, tu es bourrée de conseils sages et bienveillants, merci (aussi pour les conseils du triathlon).

Rachel, même si c'était que pour un temps court, c'était trop bien de t'avoir eu dans le bureau (et là les gens hors du labo qui lisent cette section se disent « oh la la ils doivent avoir un bureau immense vu toutes les personnes qu'il y avait dedans !»). Plus sérieusement je suis trop contente que tu fasses partie de l'équipe et franchement j'ai hâte de venir à ta soutenance.

Glenn, ou celui qui aime bien franchir les limites, c'était toujours un plaisir de discuter avec toi 2 minutes par-ci par-là au détour d'une expérience. Tu es un peu le « comic relief » de notre vie de labo, mais tu as aussi apporté des aides précieuses à mon projet, merci.

Josien, it was so nice meeting you at the retreat and you were a very welcome addition to the team. Stay awesome.

Isabelle, j'ai été très contente qu'une nouvelle personne vienne étudier le NAC, on se sent moins seule. Merci aussi pour ton aide précieuse lors de ces dernières semaines.

Jérôme, je suis toujours contente de discuter avec toi, de tout et de rien, merci de ton sourire et de faire l'accueil du bureau de Nathalie.

Julien, toujours le petit bonjour du matin et les pieds sur terre, tu es toujours là pour nous rappeler que nous sommes avant tout des êtres humains sensibles, et merci pour ça.

Augustin, merci de tous tes efforts pour m'aider avec mon ordi, et merci parce que bretelles.

Richard, merci de ton aide et de ta gentillesse (et du café !).

Gilles, merci de ta douceur et de tes conseils avisés.

Merci aussi à Grégory pour toutes les discussions, conseils, et fous-rires dans le bureau.

J'aimerais aussi remercier toute l'équipe Cohen-Salmon, notamment Anne-Cécile, Martine, Alice et Marc car pour moi on est toujours tous de la même équipe et je suis super contente de pouvoir interagir régulièrement avec chacun d'entre vous.

Je remercie aussi l'équipe Joliot, en particulier Irène, Edmond et Isabelle, avec qui on a partagé un couloir, des cafés, des discussions et plein de bons moments.

Je tiens à remercier chaleureusement Claudie et Vincent, qui rendent le travail au laboratoire possible, tout simplement.

Ensuite, j'aimerais remercier mes deux jurés de CST, Peter Vanhoutte et Cendra Agulhon. On n'accorde pas assez de crédits à ces deux CST je trouve. Personnellement, ils m'ont été vraiment très bénéfiques, et ce grâce aux deux personnes du jury. Ils ont su me faire prendre du recul sur mon projet, sur moi-même ; me mettre en confiance et me rassurer à des moments de doutes, et cela avec énormément de bienveillance. Merci beaucoup.

Un grand merci à Maya, parce que t'es géniale tout simplement.

Merci aux équipes des animaleries du CIRB.

Merci à tous les copains des Chadocs, Camille, Sarah, Alexis, Camille 2, Eugénie, Irène.

Ensuite, j'aimerais aussi remercier tous mes collaborateurs.

Jean-Pol Tassin, un neuroanatomiste hors pair avec une immense expérience.

Bruno Guiard, très professionnel, réactif, aimable. On a envoyé un colis à Atlanta ! (comprendra qui pourra).

Alexis Bemelmans et Carole Escartin du MIRCen.

Je remercie aussi les autres collaborateurs, qui ont contribué à des résultats non présents dans cette thèse, soit pour cause d'inachèvement ou d'échec, mais qui ont tout de même participer activement au projet : Denis Hervé, Sabine Lévi, la plateforme de microscopie électronique de Gif-sur-Yvette, représentée par Claire Boulogne et Cynthia Gillet, la plateforme de microscopie de l'ICM, représentée par Dominique Langui, la plateforme de microscopie électronique de l'ENS, représentée par Philippe Rostaing (eh oui on a vraiment essayé de la mettre en place la microscopie électronique !).

Enfin, pour la partie plus personnelle... il y a encore une fois beaucoup de personnes à remercier...

Tout d'abord, je voudrais remercier ma mère. Quand je me sens perdue et ne sais pas quoi faire, c'est souvent toi mon point de départ car tu sais toujours trouver les bons mots qui non seulement me font me sentir mieux mais surtout me font me poser les bonnes questions. Tu me donnes la force nécessaire pour avancer dans les moments de doutes. Cette thèse a été une épreuve à bien des égards, et je ne sais pas si j'aurais pu m'en sortir sans toi. Alors merci, tout simplement.

Ensuite je voudrais remercier le premier Dr. Capano, mon père. Tu es le premier à m'avoir donné une définition d'un doctorat, du temps où tu écrivais ta thèse, et je me souviens avoir pensé « c'est génial j'aimerais bien faire ça ». Grâce à toi, à toutes les leçons de vie que tu m'as inculquées, j'ai su que je le pouvais. C'était difficile de te voir que sporadiquement au cours de ces années de thèse, j'espère qu'on se verra plus régulièrement dans le futur (proche). Merci.

Merci à ma sœur Laura pour son soutien silencieux. On ne parle pas trop de ce genre de choses toi et moi, mais on est là l'une pour l'autre sans avoir à le demander et c'est le plus important, merci.

J'aimerais remercier tout particulièrement ma tante Andrea, qui en plus d'être une super tante est aussi une super chercheuse et un modèle. Tu m'as orientée (malgré toi) sur la voie de la recherche quand j'avais 15 ans, tu m'as accompagnée sur ce long chemin à chaque étape. Merci. L'ironie là-dedans, c'est que c'est seulement maintenant que je vais suivre ton conseil d'il y a 11 ans, et après tout ce chemin, que je suis prête à passer à autre chose.

J'aimerais aussi adresser un remerciement spécial à ma grand-mère. Babou, tu as la capacité de voir en moi des choses que je ne perçois pas. Chaque discussion avec toi est une vague de bonheur. Tu me donnes des boosts de confiance qui sont toujours les bienvenus, en particulier sur ces derniers mois. Merci du fond du cœur.

Un grand merci aussi à ma tante Tatazin et mon oncle Denis, qui ont toujours été là pour moi, particulièrement depuis que ma vie est parisienne (ainsi qu'Andrea et Philippe). Votre présence m'a été d'une aide précieuse pendant ces années, merci.

Merci au reste de ma famille pour leur soutien, leurs encouragements, leur confiance.

Merci à Emmanuel et Martine qui m'ont accueilli à bras ouverts et qui m'ont apporté leur soutien infaillible dès le début.

Merci à Justine et Anna. Les filles vous me connaissez mieux que n'importe qui et vous faites partie de moi. Vous êtes des personnes extraordinaires et j'ai de la chance de vous avoir. Merci.

Merci à Ioana et Louise. Je suis tellement contente d'avoir croisé votre chemin, d'avoir pu partagé un bout de vie et beaucoup d'histoires avec vous. Merci pour tout !

Merci à Alice et Lucie. On n'a pas coupé le cordon les filles !! Et on va pas le faire.

Merci à Célie et Clarisse pour les cartes postales et l'hébergement en Suisse.

Merci à Marion, Cécile, Antinéa, Seif, Romain, Flore & Pépé pour me rappeler d'être un peu alsacienne de temps en temps.

Merci à tous mes ami.e.s qui ont suivi de près ou de loin cette aventure et qui m'ont aidée.

Merci à l'AAFAB qui a donné un second souffle dans ma vie d'engagement, plus particulièrement à Augustin et Paula, qui m'ont rappelé ce que c'est de faire partie d'une équipe associative.

J'aimerais aussi remercier mes deux chats, Marcelin et Phoebe, parce qu'ils sont de supers compagnons qui ont rendu notamment l'écriture nocturne de cette thèse plus agréable.

Enfin, la meilleure pour la fin, merci à toi mon petit chou. Tu es, de loin, la meilleure chose qui me soit arrivée pendant ma thèse. Tu es à la fois la rencontre la plus improbable, dans le lieu le plus improbable, et en même temps la plus naturelle et la plus évidente que j'ai pu faire. Oui on a dû faire face à divers obstacles, mais ce n'était même pas difficile tellement ça coulait de source. Je sais que ces derniers mois ont été compliqués, qu'on ne s'est pas beaucoup vues et que mon humeur n'était pas au beau fixe, mais tu as toujours su faire face. Tu as toujours cru en moi, même si parfois t'étais la seule de nous deux, tu m'as toujours épaulée, soutenue. Tu es une belle personne, avec une belle âme et un grand cœur. Je suis ravie que tu sois dans ma vie, et je me sens honorée de faire partie de la tienne. Tout ce travail, c'est en grande partie grâce à toi que j'ai pu le faire. Cette thèse, je te la dois. Merci.