



UNIL | Université de Lausanne

Unicentre

CH-1015 Lausanne

<http://serval.unil.ch>

Year : 2009

Etude des propriétés dynamiques de la sécrétion régulée des vésicules glutamatergiques des astrocytes

MARCHALAND, Julie

MARCHALAND, Julie 2009 Etude des propriétés dynamiques de la sécrétion régulée des vésicules glutamatergiques des astrocytes

Originally published at : Thesis, University of Lausanne

Posted at the University of Lausanne Open Archive.
<http://serval.unil.ch>

Droits d'auteur

L'Université de Lausanne attire expressément l'attention des utilisateurs sur le fait que tous les documents publiés dans l'Archive SERVAL sont protégés par le droit d'auteur, conformément à la loi fédérale sur le droit d'auteur et les droits voisins (LDA). A ce titre, il est indispensable d'obtenir le consentement préalable de l'auteur et/ou de l'éditeur avant toute utilisation d'une oeuvre ou d'une partie d'une oeuvre ne relevant pas d'une utilisation à des fins personnelles au sens de la LDA (art. 19, al. 1 lettre a). A défaut, tout contrevenant s'expose aux sanctions prévues par cette loi. Nous déclinons toute responsabilité en la matière.

Copyright

The University of Lausanne expressly draws the attention of users to the fact that all documents published in the SERVAL Archive are protected by copyright in accordance with federal law on copyright and similar rights (LDA). Accordingly it is indispensable to obtain prior consent from the author and/or publisher before any use of a work or part of a work for purposes other than personal use within the meaning of LDA (art. 19, para. 1 letter a). Failure to do so will expose offenders to the sanctions laid down by this law. We accept no liability in this respect.



Département de Biologie Cellulaire et de Morphologie

**ETUDE DES PROPRIETES DYNAMIQUES DE LA SECRETION
REGULEE DES VESICULES GLUTAMATERGIQUES DES
ASTROCYTES**

Thèse de doctorat en Neurosciences

présentée à la
Faculté de Biologie et de Médecine
de l'Université de Lausanne

par

Julie MARCHALAND

Biologiste Cellulaire et Moléculaire
diplômée de l'Université Claude Bernard et de l'Ecole Normale Supérieure, Lyon, France

Jury

Prof. Jean-Pierre Hornung, Président
Dr. Paola Bezzi, Directeur
Prof. Romano Regazzi, Co-Directeur
Dr. Jean-Yves Chatton, Expert
Dr. Jean-Pierre Mothet, Expert

Lausanne 2009

***Programme doctoral interuniversitaire en Neurosciences
des Universités de Lausanne et Genève***



Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

<i>Président</i>	Monsieur Prof. Jean-Pierre Hornung
<i>Directeur de thèse</i>	Madame Dr Paola Bezzi
<i>Co-directeur de thèse</i>	Monsieur Prof. Romano Regazzi
<i>Experts</i>	Monsieur Dr Jean-Yves Chatton
	Monsieur Dr Jean-Pierre Mothet

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de


Madame Julie Marchaland

Master de Neurosciences Université de Lyon 1, France

intitulée

**ETUDE DES PROPRIÉTÉS DYNAMIQUES
DE LA SÉCRÉTION RÉGULÉE
DES SLMVs GLUTAMATERGIQUES DES ASTROCYTES**

Lausanne, le 15 janvier 2010


pour Le Doyen
de la Faculté de Biologie et de Médecine

Prof. Jean-Pierre Hornung

*Entonces siempre acuérdate
De lo que un día yo escribí
Pensando en ti
Como ahora pienso.*

*Nunca te entregues ni te apartes
Junto al camino, nunca digas
No puedo más y aquí me quedo.*

*La vida es bella, tú verás
Como a pesar de los pesares
Tendrás amor, tendrás amigos.*

José Agustín Goytisolo (Palabras para Julia)

A
Tout ce qui est précieux, sacré ;
Tout ce que nous avons su garder ;
Tout ce que nous avons perdu ;

A
L'enfance, nos rêves, qui s'envolent ;
La sagesse qui viendra, peut-être, un jour ;
L'amour et la vie qui nous tiennent ici ;

A
Ceux que nous avons trouvés ;
Ceux qui nous sont restés ;
Ceux que nous avons perdus ;

A
Benoît, Mes parents, Ma sœur.

REMERCIEMENTS

Un grand merci à Paola pour m'avoir choisie pour commencer à constituer son groupe et mener à bien ces projets. Merci pour la confiance dont elle m'a toujours honorée. Etant l'opposé l'une de l'autre, il ne fut pas difficile de travailler ensemble. Elle est aussi volubile que je suis taiseuse, aussi extravertie que je suis réservée, aussi enthousiaste que je suis pondérée, nous ne pouvions faire autrement que nous entendre !!! Nous avons fait, je crois, du bon boulot ensemble. Et il en reste toujours plus à faire...

Merci à tous ceux qui ont contribué à ce travail :

- Corrado, sans qui ces projets auraient probablement ressemblé à tout autre chose.
- Mes collègues, Steeve, Julien et Ilaria pour leur aide et leur soutien lors de la rédaction et également pour leur gentillesse, leur solidarité et leur bonne humeur.
- Mirko, pour ses remarques scientifiques toujours pertinentes.
- Un merci tout particulier à Fanny pour son « soutien logistique », sa joie de vivre, sa patience et son très efficace sens de l'organisation.
- Hiltrud, pour m'avoir tout appris des cultures.
- Et tous ceux à qui j'ai pu demander aide ou conseils : Sonia, Julien P., Anne, Vanessa et Yannick (et encore bien d'autres que j'oublie probablement).

Merci biensûr à Benoit. Pour tous ces petits plats préparés avec amour (et crème fraîche...) qui ont largement contribué à la réussite de ce projet !!! Pour sa patience, le long de ces semaines, de ces mois, où nous nous sommes croisés, lui me laissant endormie le matin et allant se coucher lorsque j'étais à peine arrivée. Jamais une parole acerbe, jamais une remarque amère. Bien plus que de la gentillesse et de la patience, il m'a offert un véritable trésor. Dans ce pays, où il n'y a même pas de mer, où le sel pousse dans les montagnes et où il neige la moitié de l'année, il m'a donné un foyer. Il a ouvert les bras et j'y ai trouvé mon pays. Il sait prendre le temps de regarder la beauté de petites choses et rendre la vie belle. Il a su me voir, m'entendre et m'aimer. C'est pour cet amour et ce respect que je voudrais le remercier aujourd'hui. Et lui demander pardon de n'avoir pas été la compagne agréable et disponible qu'il mérite.

Merci aussi à mes parents puisqu'il n'est rien de moi qui ne vienne d'eux. C'est mon père qui m'a mis mon premier « microscope » entre les mains, en l'occurrence, un compte-fil avec lequel nous regardions ce qui nous tombait sous la main, fourmis, fleurs, sable, etc. C'est lui qui m'a appris à regarder les choses, les chauves-souris à la tombée de la nuit, les têtards se transformant en grenouilles au printemps et les visages cachés dans les cailloux. C'est de lui que je tiens mes qualités scientifiques. « Procédons avec ordre et méthode » disait-il. Combien d'heures silencieuses avons-nous passées, penchés l'un à côté de l'autre, avec patience et minutie pour réaliser jeux en cartons, bateaux, avions et ville en lego. Ma logique me vient de lui et de ces soirées passées ensemble à jouer à de jeux de société. De ma mère, je ne tiens aucunes de mes qualités scientifiques, c'est évident. Rigueur, organisation, minutie ne sont pas ses points forts. Elle m'a donné l'amour ainsi que

REMERCIEMENTS

la colère et la douleur qui vont avec. Elle m'a donné la ténacité et la générosité. Elle m'a appris à regarder les gens, les écouter, les comprendre et tenter de les aimer. Elle m'a appris à aller au contact, à me mettre en danger et à donner. Il m'a appris à observer, elle m'a appris la vie. Je crois que je leur dois d'être, aujourd'hui, derrière un microscope à observer le vivant.

Merci à mes amis d'ici, de Lyon ou d'ailleurs : Ambre (pour avoir toujours été présente en cas de besoin et pour me comprendre au-delà des mots), Daniel (merci, petit frère, même si tu ne donnes jamais de tes nouvelles), Caco (pour avoir compris mon besoin de partir et de ne m'en avoir pas tenu rigueur), Poupoule (pour son amitié, son soutien et m'avoir un jour invitée à un certain nouvel an...), Guillaume (un français en terre suisse, comme un peu de chaleur et de compréhension), Mirko (langues, cuisines, politique et science, ce fut un plaisir de pouvoir discuter de tout ça avec toi) mais également à Guillaume (celui de Benoit) et Claire (pour m'avoir accueillie dans la « famille jurassienne » avec autant de facilité et de gentillesse). Spéciale dédicace à Val qui passe aussi sa thèse cette année et à Chameau qui est le meilleur faux ami de tous les temps.

ETUDES DES PROPRIETES DYNAMIQUES DE LA SECRETION REGULEE DES VESICULES GLUTAMATERGIQUES DES ASTROCYTES.

JULIE MARCHALAND

Université de Lausanne, Département de Biologie Cellulaire et de Morphologie

RESUME GRAND PUBLIC

Le cerveau est composé de différents types cellulaires, dont les neurones et les astrocytes. Faute de moyens pour les observer, les astrocytes sont très longtemps restés dans l'ombre alors que les neurones, bénéficiant des outils *ad hoc* pour être stimulés et étudiés, ont fait l'objet de toutes les attentions. Le développement de l'imagerie cellulaire et des outils fluorescents ont permis d'observer ces cellules non électriquement excitables et d'obtenir des informations qui laissent penser que ces cellules sont loin d'être passives et participent activement au fonctionnement cérébral. Cette participation au fonctionnement cérébral se fait en partie par le biais de la libération de substances neuro-actives (appelées gliotransmetteurs) que les astrocytes libèrent à proximité des synapses permettant ainsi de moduler le fonctionnement neuronal. Cette libération de gliotransmetteurs est principalement causée par l'activité neuronale que les astrocytes sont capables de sentir. Néanmoins, nous savons encore peu de chose sur les propriétés précises de la libération des gliotransmetteurs. Comprendre les propriétés spatio-temporelles de cette libération est essentiel pour comprendre le mode de communication de ces cellules et leur implication dans la transmission de l'information cérébrale. En utilisant des outils fluorescents récemment développés et en combinant différentes techniques d'imagerie cellulaire, nous avons pu obtenir des informations très précises sur la libération de ces gliotransmetteurs par les astrocytes. Nous avons ainsi confirmé que cette libération était un processus très rapide et qu'elle était contrôlée par des augmentations de calcium locales et rapides. Nous avons également décrit une organisation complexe de la machinerie supportant la libération des gliotransmetteurs. Cette organisation complexe semble être à la base de la libération extrêmement rapide des gliotransmetteurs. Cette rapidité de libération et cette complexité structurelle semblent indiquer que les astrocytes sont des cellules particulièrement adaptées à une communication rapide et qu'elles peuvent, au même titre que les neurones dont elles seraient les partenaires légitimes, participer à la transmission et à l'intégration de l'information cérébrale.

ETUDES DES PROPRIETES DYNAMIQUES DE LA SECRETION REGULEE DES VESICULES GLUTAMATERGIQUES DES ASTROCYTES.

JULIE MARCHALAND

Université de Lausanne, Département de Biologie Cellulaire et de Morphologie

RESUME

De petites vésicules, les « SLMVs » ou « Synaptic Like MicroVesicles », exprimant des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGluTs) et libérant du glutamate par exocytose régulée, ont récemment été décrites dans les astrocytes en culture et *in situ*. Néanmoins, nous savons peu de chose sur les propriétés précises de la sécrétion de ces SLMVs. Contrairement aux neurones, le couplage stimulus-sécrétion des astrocytes n'est pas basé sur l'ouverture des canaux calciques membranaires mais nécessite l'intervention de seconds messagers et la libération du calcium par le reticulum endoplasmique (RE). Comprendre les propriétés spatio-temporelles de la sécrétion astrocytaire est essentiel pour comprendre le mode de communication de ces cellules et leur implication dans la transmission de l'information cérébrale. Nous avons utilisé des outils fluorescents récemment développés pour étudier le recyclage des vésicules synaptiques glutamatergiques comme les colorants styryles et la pHluorin afin de pouvoir suivre la sécrétion des SLMVs à l'échelle de la cellule mais également à l'échelle des événements. L'utilisation combinée de l'épifluorescence et de la fluorescence à onde évanescente nous a permis d'obtenir une résolution temporelle et spatiale sans précédent. Ainsi avons-nous confirmé que la sécrétion régulée des astrocytes était un processus très rapide (de l'ordre de quelques centaines de millisecondes). Nous avons découvert que cette sécrétion est contrôlée par des augmentations de calcium locales et rapides. Nous avons également décrit des compartiments cytosoliques délimités par le RE à proximité de la membrane plasmique et contenant les SLMVs. Cette organisation semble être à la base du couplage rapide entre l'activation des GPCRs et la sécrétion. L'existence de compartiments subcellulaires indépendants permettant de contenir les messagers intracellulaires et de limiter leur diffusion semble compenser de manière efficace la non-excitabilité électrique des astrocytes. Par ailleurs, l'existence des différents pools de vésicules recrutés séquentiellement et fusionnant selon des modalités distinctes ainsi que l'existence de mécanismes permettant le renouvellement de ces pools lors de la stimulation suggèrent que les astrocytes peuvent faire face à une stimulation soutenue de leur sécrétion. Ces données suggèrent que la libération de gliotransmetteurs par exocytose régulée n'est pas seulement une propriété des astrocytes en culture mais bien le résultat d'une forte spécialisation de ces cellules pour la sécrétion. La rapidité de cette sécrétion donne aux astrocytes toutes les compétences pour pouvoir intervenir de manière active dans la transmission et l'intégration de l'information.

STUDY OF REGULATED SECRETION DYNAMICS OF GLUTAMATERGIC VESICLES IN ASTROCYTES.

JULIE MARCHALAND

University of Lausanne, Department of Cellular Biology and Morphology

ABSTRACT

Recently, astrocytic synaptic like microvesicles (SLMVs), that express vesicular glutamate transporters (VGluTs) and are able to release glutamate by Ca^{2+} -dependent regulated exocytosis, have been described both in tissue and in cultured astrocytes. Nevertheless, little is known about the specific properties of regulated secretion in astrocytes. Important differences may exist between astrocytic and neuronal exocytosis, starting from the fact that stimulus-secretion coupling in astrocytes is voltage independent, mediated by G-protein-coupled receptors and the release of Ca^{2+} from internal stores. Elucidating the spatiotemporal properties of astrocytic exo-endocytosis is, therefore, of primary importance for understanding the mode of communication of these cells and their role in brain signaling. We took advantage of fluorescent tools recently developed for studying recycling of glutamatergic vesicles at synapses like styryl dyes and pHluorin in order to follow exocytosis and endocytosis of SLMVs at the level of the entire cell or at the level of single event. We combined epifluorescence and total internal reflection fluorescence imaging to investigate, with unprecedented temporal and spatial resolution, the events underlying the stimulus-secretion in astrocytes. We confirmed that exo-endocytosis process in astrocytes proceeds with a time course on the millisecond time scale. We discovered that SLMVs exocytosis is controlled by local and fast Ca^{2+} elevations; indeed submicrometer cytosolic compartments delimited by endoplasmic reticulum (ER) tubuli reaching beneath the plasma membrane and containing SLMVs. Such complex organization seems to support the fast stimulus-secretion coupling reported here. Independent subcellular compartments formed by ER, SLMVs and plasma membrane containing intracellular messengers and limiting their diffusion seem to compensate efficiently the non-electrical excitability of astrocytes. Moreover, the existence of two pools of SLMVs which are sequentially recruited suggests a compensatory mechanisms allowing the refill of SLMVs and supporting exocytosis process over a wide range of multiple stimuli. These data suggest that regulated secretion is not only a feature of cultured astrocytes but results from a strong specialization of these cells. The rapidity of secretion demonstrates that astrocytes are able to actively participate in brain information transmission and processing.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	
AA	Acide Arachidonique
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl- γ -i soxazolepropionate
ANP	Peptide Natriurétique Atrial
AO	Acridine Orange
ATP	Adénosine Triphosphate

B	
BDNF/proBDNF	Brain Derived Neurotrophique Factor
BafA1	Bafilomycine A1

C	
CA	Corne d'Ammon
[Ca ²⁺] _i	Concentration Intracellulaire de Ca ²⁺
cDNA	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
COX	Cyclo-oxygénase
CXCR	Récepteur des chémokines de type CXC
CXCL12/ SDF-1 α	Chemokine (type C-X-C) ligand 12 ou Stromal Cell-Derived Factor 1 alpha

D	
DHPG	(RS)-3,5-dihydrophenylglycine

E	
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EPOX	Epo-oxygénase

F	
FM1-43	<i>N</i> -(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(4- (dibutylamino)styril)pyridinium dibromide
FM4-64	<i>N</i> -(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(6-(4- (diéthylamino)phényl)hexatriényl)pyridi nium dibromide
FWHM	Full width half maximum / largeur à mi- hauteur

G	
GABA	γ -amino butyric acid
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GLAST1	Glutamate/Aspartate Transporter 1
GLT1	Glutamate Transporter 1
GLUT1/3	Glucose Transporter (isoformes 1 et 3)
GPCRs	G Protein Coupled Receptors
GTP	Guanosine Triphosphate

I	
IL	Interleucine
IFN	Interféron
IP ₃	Inositol Triphosphate

K	
KO (souris)	Souris Knock Out

L	
LDH 1/5	Lactate Déshydrogénase (isoformes 1 et 5)
LOX	Lypo-oxygénase

M	
MAP-2	Microtubule Associated Protein 2
MCT1/2/4	Monocarboxylate Transporter (Isoformes 1,2 et 4)
mGluR	metabotropic Glutamate Receptor

N	
NPY	neuropeptide Y
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NR2B	Sous unité 2B du récepteur au NMDA
NGF	Nerve Growth factor

P	
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
P2X7	Récepteur Purinergique de type X ; isoforme 7
P2Y1	Récepteur Purinergique de type Y ; isoforme 1

R	
rab3a	Ras Associated Binding protein 3a
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
RE	Reticulum Endoplasmique

S	
SDF1 α	Stromal Cell Derived Factor 1 α
SgII	Ségréto granine II
SICs	Slow Inward Courants
SLMVs	Synaptic Like Microvesicles
SNAP-23/25	Synaptosomal Associated Protein – isoformes 23 et 25
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SVs	Synaptic Vesicles

T	
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence

U	
UTP	Uridine Triphosphate

V	
VGluTs 1/2/ 3	Vesicular Glutamate Transporters (isoformes 1, 2 et 3)

W	
WM	White matter - substance blanche

1. INTRODUCTION	19
1.1. Astrocytes	19
1.2. Astrocytes et neurotransmission glutamatergique	22
1.2.1. <i>Capture des neurotransmetteurs</i>	22
1.2.2. <i>Couplage neuro-métabolique</i>	23
1.2.2.1. Couplage métabolique	24
1.2.2.2. Couplage neuro-vasculaire	26
1.2.3. <i>Modulation de la transmission glutamatergique</i>	27
1.3. Les astrocytes : cellules sécrétrices spécialisées	30
1.3.1. <i>Les astrocytes synthétisent et libèrent des substances neuro-actives</i>	30
1.3.2. <i>Mécanismes de libération des acides aminés par les astrocytes</i>	31
1.3.2.1. Mécanismes de libération calcium indépendants	31
1.3.2.2. Mécanismes dépendants du calcium intracellulaire	32
1.3.3. <i>Exocytose régulée de gliotransmetteurs par les astrocytes</i>	33
1.4. La sécrétion régulée	36
1.4.1. <i>Les différences voies de sécrétion régulée</i>	36
1.4.2. <i>Le couplage stimulus/sécrétion</i>	39
1.5. Méthodes d'observation de la sécrétion régulée	41
1.5.1. <i>Principe de la microscopie TIRF</i>	42
1.5.2. <i>Outils fluorescents utilisés pour l'étude de la sécrétion régulée</i>	43
1.5.2.1. Les rapporteurs fluorescents des compartiments intracellulaires	43
1.5.2.2. Les rapporteurs fluorescents des processus d'exo-endocytose	44
1.5.2.3. La pHluorin	45
2. RÉSULTATS	47
2.1. Préambule	47
2.2. SDF1- α (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: Imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy	49
2.2.1. <i>Finalité de l'article</i>	49
2.2.2. <i>Participation personnelle</i>	49
2.3. Fast subplasma membrane Ca ²⁺ transients control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes	61
2.3.1. <i>Finalité de l'article</i>	61
2.3.2. <i>Participation personnelle</i>	61
2.4. Caractérisation des SLMVs glutamatergiques	93
2.4.1. <i>Matériel et méthodes</i>	93
2.4.2. <i>Expression des VGluTs sur les différents compartiments intracellulaires</i>	93
2.4.3. <i>Caractérisation des compartiments VGluTs positifs</i>	94
2.4.4. <i>Relation entre SLMVs et DCGs</i>	96
2.4.5. <i>Conclusion</i>	97
3. DISCUSSION	99
3.1. Caractérisation des SLMVs glutamatergiques	99
3.2. Fusion et recyclage des SLMVs	102
3.2.1. <i>Modalités de fusion des SLMVs</i>	102
3.2.2. <i>Dynamiques des processus d'exocytose, d'endocytose et de réacidification des SLMVs</i>	103
3.3. Couplage stimulus/sécrétion	105
3.3.1. <i>Microdomaines structuraux formés par le RE, des SLMVs et la membrane plasmique</i>	105
3.3.2. <i>Augmentations calciques rapides, transitoires et localisées contrôlant la sécrétion régulée des SLMVs</i>	106
3.4. Conclusion générale et perspectives	107
4. ANNEXES	113
4.1. Publications	113
4.2. Présentations de posters / participation aux congrès	113
5. REFERENCES	115

LISTE DES FIGURES

. Figure 1. Interaction morphologique des astrocytes et des neurones au niveau du cortex. -----	20
. Figure 2. Différentes morphologies d'astrocytes selon les couches de cortex chez l'humain. -----	21
. Figure 3. Organisation de la synapse glutamatergique et cycle glutamate/ glutamine. -----	23
. Figure 4. Représentation schématique du couplage métabolique entre neurones et astrocytes lors l'activité neuronale. -----	25
. Figure 5. Position stratégique des astrocytes entre la vasculature cérébrale et les neurones. -----	26
. Figure 6. Représentation schématique de l'implication des astrocytes dans le couplage vasculaire. -----	27
. Figure 7. Modulation de la transmission glutamatergique par les astrocytes: capture du glutamate. -----	27
. Figure 8. Modulation de la transmission glutamatergique par les astrocytes: libération du glutamate. -----	29
. Figure 9. Différents mécanismes de libération du glutamate. -----	32
. Figure 10. Les SLMVs glutamatergiques des astrocytes. -----	34
. Figure 11. Dynamiques de la sécrétion régulée des selon le type d'organelle et le type cellulaire. -----	38
. Figure 12. Différents modèles de domaines calciques. -----	40
. Figure 13. Schéma du fonctionnement de la microscopie TIRF. -----	42
. Figure 14. Utilisation de la FM4-64 pour suivre la sécrétion régulée. -----	45
. Figure 15. Utilisation de la pHluorin pour suivre la sécrétion régulée. -----	46
. Figure 16. Estimation de la taille des vésicules exprimant les VGLuTs. -----	94
. Figure 17. Distribution temporelle des évènements de fusion impliquant des vésicules exprimant le VGLuT1-pHluorin et contenant l'Alexa-Tf 568. -----	95
. Figure 18. Estimation de la taille des vésicules exprimant VgluT1-mCherry et Phogrin-eGFP. -----	96
. Figure 19. Schéma des microdomaines structurels et fonctionels regroupant le RE, les SLMVs et la membrane plasmique. -----	107
. Figure 20. Hypothèse du rôle des protéines Homer1b et Homer1a sur les microdomaines calciques et la sécrétion régulée des astrocytes. -----	109
. Figure 21. Influence de l'activation du récepteur TNFR1 sur la libération de neurotransmetteurs. -----	110

1. INTRODUCTION

Il y a désormais 150 ans que le concept de neuroglie est né. D'abord envisagé comme un tissu conjonctif donnant leur forme aux éléments neuronaux et les maintenant en place, il a évolué avec les observations histologiques décrivant diverses morphologies des éléments gliaux. On a vu ainsi apparaître différentes catégories de cellules gliales: astrocytes, oligodendrocytes (formant la macroglie) et la microglie pour le système nerveux central (SNC) et d'autres cellules particulières pour le système nerveux périphérique (SNP) semblant posséder chacune une fonction particulière. Bien que décrites assez tôt, les cellules gliales ont longtemps été tenues dans l'ombre. La découverte de l'excitabilité électrique des neurones a permis de faire un bond considérable dans la compréhension de la transmission des informations dans le cerveau, de mettre en avant le fonctionnement des synapses et l'existence des différents neurotransmetteurs. Néanmoins, à cause de leur non-excitabilité électrique, les cellules gliales ont été mises de côté faute de moyen pour observer et comprendre leur fonctionnement. L'avènement de nouvelles techniques d'enregistrement et d'observation, comme l'imagerie calcique, a permis de mettre en lumière une forme différente d'excitabilité dans les cellules gliales : l'excitabilité calcique. Cette excitabilité calcique est codée sous forme de changements de la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_i$), changements qui peuvent survenir de manière spontanée ou suite à une stimulation provoquée par l'activité neuronale ou un changement environnemental. La découverte de l'excitabilité calcique des astrocytes a permis de mettre en évidence que les astrocytes étaient capables de moduler leur activité en fonction de différents signaux. Par la suite, il a été montré qu'ils pouvaient, en retour, libérer des substances pouvant moduler le fonctionnement cérébral. Cette communication entre les astrocytes et les autres cellules cérébrales ouvre des perspectives inespérées pour comprendre la complexité et la puissance de la transmission et de l'intégration des informations par le cerveau. Néanmoins, si nous voulons pouvoir comprendre et intégrer ce type de communication, il reste beaucoup à apprendre sur le fonctionnement et l'implication des astrocytes dans le fonctionnement cérébral.

1.1. Astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC. Au cours de la phylogénie et de la complexité cérébrale, le nombre d'astrocytes augmente considérablement par rapport au nombre de neurones (Nedergaard et al., 2003). Dans le cortex humain, il y a 1.4 astrocytes pour un seul neurone (Bass et al., 1971). Il semble évident que cette augmentation du nombre d'astrocytes au cours l'évolution correspond à la complexification des réseaux neuronaux (**figure 1**) : l'augmentation de la densité et de la complexité des synapses nécessite un niveau supérieur de modulation et d'intégration ainsi qu'un besoin métabolique plus grand. Néanmoins, sans base morphologique ni fonctionnelle, cette hypothèse n'a pas été exploitée jusqu'à récemment.

Les astrocytes possèdent, dans le système nerveux, une position et une morphologie assez particulière, ayant des connections à la fois avec les éléments neuronaux et vasculaires. Traditionnellement observée par immunochimie contre la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein ;

un composant du cytosquelette astrocytaire), la morphologie des astrocytes reste, pour beaucoup, assez sommaire : un corps cellulaire, quelques grands processus et un pied vasculaire. Néanmoins, des méthodes, récemment mises en place, comme la microinjection d'un colorant fluorescent à l'intérieur d'un seul astrocyte (Bushong et al., 2002) ou l'utilisation de souris transgéniques, exprimant des protéines fluorescentes spécifiquement dans les astrocytes, ont permis de révéler une morphologie et une organisation territoriale des astrocytes bien plus complexe. Ces nouvelles méthodes de marquage ont révélé que l'immunochimie contre la GFAP ne permettait de visualiser que 15% du volume réel des astrocytes (Bushong et al., 2002). Ces techniques ont, non seulement, permis d'observer que les astrocytes possédaient un nombre important de petits processus qui augmentent considérablement la surface de contact des astrocytes, mais elles ont également permis de découvrir une distribution très ordonnée de ces cellules. Chaque astrocyte couvre une zone donnée du cerveau contenant des éléments vasculaires et des milliers de synapses (voire des millions chez l'humain) mais pénètre, au minimum, dans les zones astrocytaires voisines (Bushong et al., 2002; Bushong et al., 2004). La surface cellulaire des astrocytes est couverte d'extensions lamellaires et de protusions filopodiales (Chao et al., 2002). Par ailleurs, la plupart des astrocytes possède également des pieds vasculaires en contact avec les vaisseaux sanguins qui leur permettent de contribuer à la formation de la barrière hémato-encéphalique (Simard et al., 2003, **figure 1**).

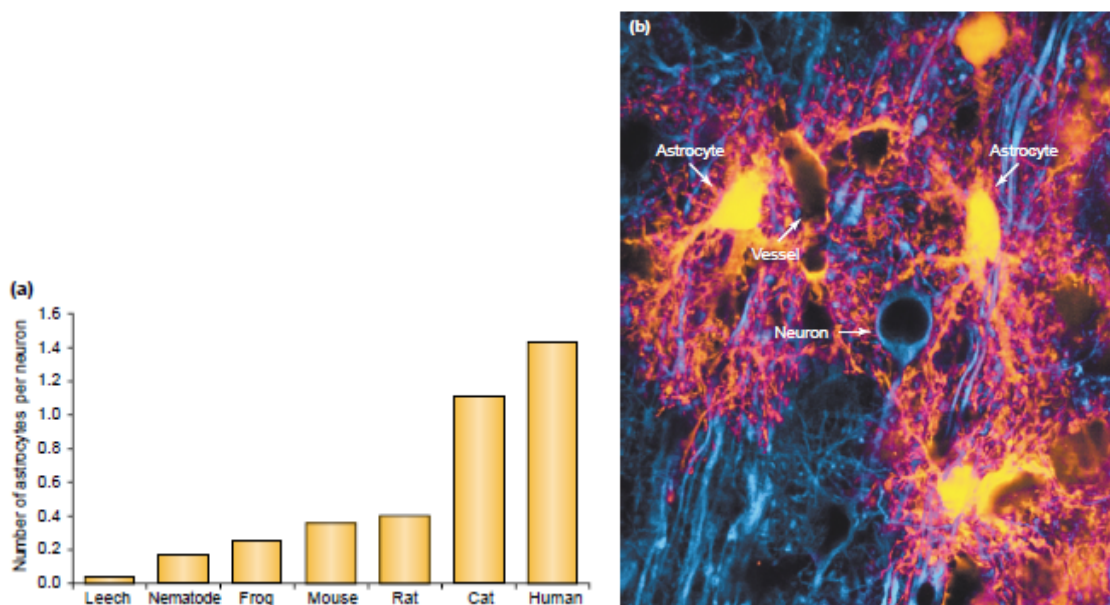


Figure 1.

Interaction morphologique des astrocytes et des neurones au niveau du cortex.

(D'après Nedergaard et al., 2003)

(a). Le nombre d'astrocytes, par rapport au nombre de neurones, pour différentes espèces montre que l'augmentation de ce rapport va de paire avec l'augmentation de la taille et de la complexité du cerveau. (b). Organisation complexe des différents types cellulaires du cortex de rat. Les neurones sont marqués avec un anticorps contre une protéine du cytosquelette (MAP-2 ; en bleu) ; les astrocytes expriment une protéine fluorescente (eGFP ; en jaune) ; un petit vaisseau sanguin se distingue grâce au marquage des pieds vasculaires des astrocytes.

Ces nouvelles données morphologiques permettent de mieux comprendre comment les astrocytes peuvent, effectivement, contribuer à un niveau supérieur à la modulation et à l'intégration de l'information cérébrale.

Jusqu'à très récemment, on supposait que les astrocytes formaient un type cellulaire homogène qui possédait les mêmes caractéristiques quelque soit la région cérébrale dans laquelle ils se trouvaient. Néanmoins, depuis quelques années, plusieurs études mettent en évidence une hétérogénéité croissante parmi les astrocytes supportée par différentes morphologies (Matthias et al., 2003; Grass et al., 2004). Par ailleurs, des études très récentes sur les astrocytes corticaux humains ont permis d'observer des morphologies très différentes parmi les astrocytes humains dont certaines que l'on ne retrouve pas chez les mammifères non primates (Oberheim et al., 2006; Oberheim et al., 2009; **figure 2**).

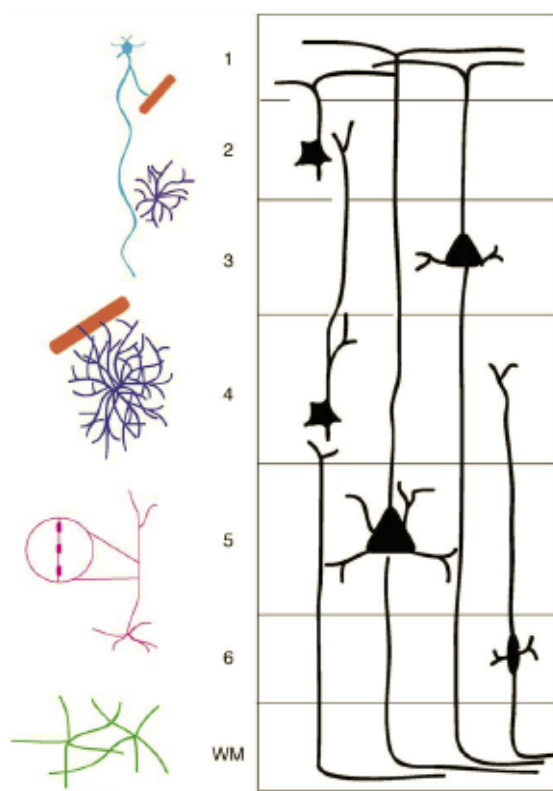


Figure 2.
Différentes morphologies d'astrocytes (gauche)
selon les couches de cortex (droite) chez
l'humain.

(D'après Oberheim et al., 2006)

Les astrocytes interlaminaires spécifiques aux primates (en bleu clair) sont localisés dans la couche 1 et projettent de longues fibres au travers du cortex jusqu'aux couches 3 et 4. Les astrocytes protoplasmiques (en bleu foncé) sont localisés dans les couches 2 à 6 et varient en taille (représenté ici dans les couches 2 et 4). Les astrocytes protoplasmiques sont organisés en domaines avec les neurones et les vaisseaux sanguins (en rose). Les astrocytes polarisés (en rose) possèdent également des longs processus mais sont localisés dans les couches 5 et 6 et présentent des varicosités le long de leurs processus (voir grossissement). Les astrocytes fibreux (en vert) sont localisés dans la substance blanche (WM) et ne sont pas organisés en domaines. Barre d'échelle, 100 μm .

De nombreuses études montrent que des changements importants interviennent dans la morphologie des astrocytes lors de conditions pathologiques (trauma, ischémie, maladies neurodégénératives, etc.). La perte de l'organisation des astrocytes en domaines disjoints a, d'ailleurs, été mise en cause dans certains modèles d'épilepsie (Oberheim et al., 2008). Il est évident que notre connaissance et notre compréhension de la diversité des astrocytes sont encore limitées. Néanmoins, il est raisonnable de penser qu'il nous faudra atteindre une classification similaire à celle obtenue avec les neurones. Il nous faudra tenir compte de leur particularité, non seulement en fonction de la région cérébrale où ils sont situés, mais également en fonction de leurs partenaires neuronaux, gliaux et vasculaires.

1.2. Astrocytes et neurotransmission glutamatergique

Bien que l'on ignore toujours comment la diversité morphologique des astrocytes supporte leurs différentes fonctions, cette morphologie particulière, ainsi que la position stratégique des astrocytes entre les neurones et les vaisseaux, a toujours laissé penser qu'ils pouvaient être un élément de communication entre les différents éléments cérébraux. Le premier à suggérer cette idée fut Camillo Golgi à la fin du 19^{ème} siècle (Golgi, 1898). Néanmoins, c'est seulement récemment que des études ont mis en évidence les interactions dynamiques que suggéraient ces interactions structurelles. Ces nouvelles perspectives mettent en avant les astrocytes comme des cellules polyvalentes participant à de nombreux processus cérébraux et qui fonctionnent comme des éléments d'intégration locale qui permettent de faire le lien entre les éléments neuronaux et non neuronaux (Volterra and Meldolesi, 2005). Bien que les astrocytes soient présents dans toutes les régions cérébrales et en contact avec les différents types neuronaux, la prédominance du glutamate et des synapses glutamatergiques dans le fonctionnement cérébral a largement orienté les études vers une compréhension de l'implication des astrocytes dans l'homéostasie du glutamate et la transmission glutamatergique. Ces études ont permis de montrer l'importance du rôle des astrocytes dans le maintien de l'activité synaptique et dans sa modulation.

1.2.1. Capture des neurotransmetteurs

Il est nécessaire, pour de maintenir une activité synaptique optimale, que les neurotransmetteurs soient capturés suite à la libération neuronale et que le pool de neurotransmetteurs des terminaisons synaptiques soit reconstitué. Les astrocytes maintiennent la concentration extracellulaire du glutamate à un faible niveau ($<1 \mu\text{M}$). La capture du glutamate par les astrocytes permet de faire cesser son action comme neurotransmetteur, l'empêche d'atteindre une concentration exocytotoxique et le transforme en substrat métabolique (Rothman and Olney, 1986; Choi, 1988; Sonnewald et al., 1997). Une récente publication souligne l'importance de la présence astrocytaire autour des synapses excitatrices pour l'élimination du glutamate et, par conséquent, pour l'activité synaptique (Oliet et al., 2001). Les astrocytes sont particulièrement bien équipés pour maintenir un niveau très faible de glutamate extracellulaire : des transporteurs possédant une forte affinité pour le glutamate (GLT1 et GLAST1) sont fortement exprimés au niveau de leurs processus et jouent un rôle primordial dans la capture du glutamate (Rothstein et al., 1996; Rauen et al., 1998). La modulation de ces transporteurs peut se faire soit de façon assez lente soit très rapidement (Davis et al., 1998; Duan et al., 1999; Munir et al., 2000; Poitry-Yamate et al., 2002). La capture du glutamate est un processus électrogénique et gourmand en énergie puisqu'une seule molécule de glutamate est cotransportée avec trois Na^+ (ou 2 Na^+ et 1H^+) en échange d'un K^+ et d'un OH^- (ou 1HCO_3^-) (Robinson and Dowd, 1997). La conséquence de cette stœchiométrie est une élévation de la concentration sodique accompagnée par une acidification intracellulaire et une alcalinisation extracellulaire. Ces modifications de l'homéostasie sont ensuite rectifiées par les astrocytes grâce à différents transports ioniques ou aqueux (Simard and Nedergaard, 2004).

Une fois capturé par les astrocytes, le glutamate est converti en glutamine par la glutamine synthase (Hertz, 1979; Hallermayer et al., 1981; Loo et al., 1995; Hertz, 2004). La glutamine est alors libérée dans le milieu extracellulaire par un transporteur spécifique des astrocytes (Broer et al., 2004) et capturée par les neurones par un transporteur spécifique des neurones (Mackenzie and Erickson, 2004). La glutamine est ensuite retransformée en glutamate par les neurones pour remplir à nouveau les vésicules synaptiques (**figure 3**). A cause de l'action de la glutamine synthase, la concentration cytosolique du glutamate dans les astrocytes est assez faible : 0.1–5mM (Attwell et al., 1993). Elle est, néanmoins, suffisante pour permettre aux transporteurs vésiculaires (VGLuTs) d'accumuler le glutamate (~20mM) dans les vésicules astrocytaires.

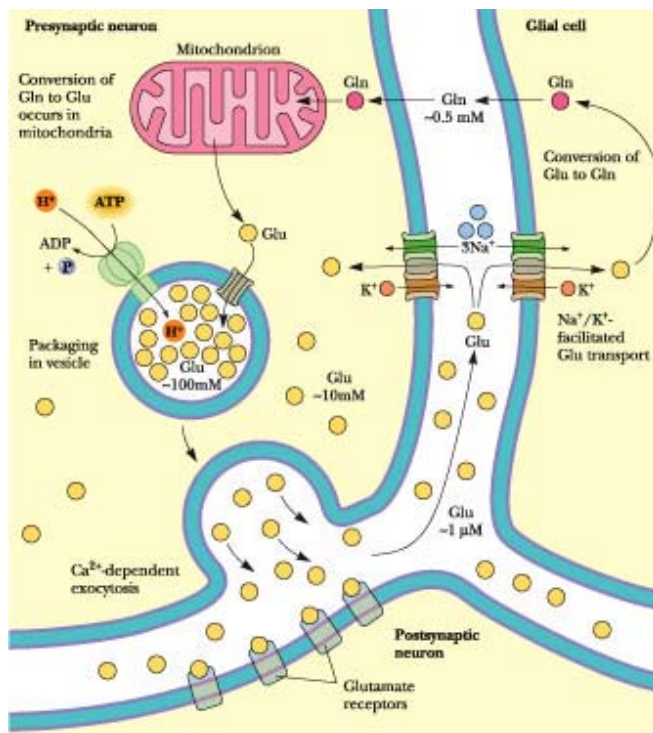


Figure 3. Organisation de la synapse glutamatergique et cycle glutamate/glutamine.

Le glutamate est libéré dans la fente synaptique lors de l'activité neuronale, il est alors capturé par les astrocytes avoisinants, transformé en glutamine et recapté par les neurones qui retransforment la glutamine en glutamate.

1.2.2. Couplage neuro-métabolique

Il est aujourd'hui certain que les astrocytes sont un élément essentiel du couplage neuro-métabolique. De nouvelles études ont montré que les astrocytes contrôlaient le flux sanguin local et apportaient aux neurones les substrats énergétiques nécessaires au fonctionnement neuronal (Zonta et al., 2003b; Mulligan and MacVicar, 2004; Magistretti, 2006; Takano et al., 2006).

Le cerveau humain représente seulement 2% de la masse corporelle totale mais utilise environ 20% de l'apport énergétique (Magistretti and Pellerin, 1999). Bien que ce rapport varie selon les espèces, l'apport de substrats énergétiques aux cellules cérébrales est crucial pour tous les animaux. Cette énergie est consommée pour maintenir le potentiel de membrane au repos via la pompe Na^+/K^+ /ATPase, réaliser la signalisation post-synaptique, recycler les neurotransmetteurs et réaliser la signalisation calcique (Attwell and Laughlin, 2001; Laughlin, 2001). Dans la mesure où le cerveau ne contient que de très faibles réserves d'énergie, les substrats énergétiques nécessaires à l'activité

neuronale doivent être apportés en permanence sous forme de glucose et d'oxygène par le système vasculaire.

La position stratégique des astrocytes entre les neurones et les vaisseaux sanguins laisse supposer que les astrocytes participent au couplage neuro-métabolique. Certains processus des astrocytes enveloppent les synapses tandis que d'autres entourent les capillaires. Les astrocytes forment donc une barrière cellulaire entre le flux sanguin et les neurones (Simard et al., 2003). La morphologie des astrocytes est particulièrement bien adaptée pour « sentir » l'activité synaptique, prélever des substrats énergétiques du sang et les transférer aux neurones et moduler le flux sanguin en fonction de l'activité synaptique.

1.2.2.1. Couplage métabolique

Le glutamate libéré dans l'espace synaptique est recapté par les astrocytes grâce à des transporteurs membranaires du glutamate : GLAST et GLT1. L'augmentation sodique causée par la capture du glutamate active la pompe Na^+/K^+ /ATPase (Pellerin and Magistretti, 1997), l'entrée du glucose (Loaiza et al., 2003) et son utilisation (Pellerin and Magistretti, 1994). L'augmentation de la glycolyse des astrocytes par une stimulation glutamatergique conduit à la production de lactate qui est libéré dans l'espace extracellulaire. Ce lactate est alors recapté par les neurones qui l'utilisent pour produire l'énergie nécessaire à leur activité (**figure 4**). Chaque molécule de lactate, qui entre dans le cycle des acides tricarboxylique et dans la phosphorylation oxydative, permet de produire 18 molécules d'ATP. L'activité neuronale peut, de cette manière, être maintenue en absence du glucose avec le lactate comme seul substrat énergétique (Morgenthaler et al., 2006). De plus, un système spécifiquement dédié au transport du lactate entre les neurones et les astrocytes a été mis en évidence par l'identification de transporteur des monocarboxylates (MCT) dans le SNC. Trois isoformes des MCT ont été observées dans le cerveau : MCT1, MCT2 et MCT4. MCT1 est exprimé par les cellules endothéliales et les astrocytes alors que MCT4 est exclusivement exprimé par les astrocytes. MCT2 est l'isoforme neuronale prédominante (Pierre and Pellerin, 2005). Cette expression spécifique des MCT apporte la preuve d'un échange astrocyte/neurone du lactate. Par ailleurs, différentes isoformes des LDH (lactate déshydrogénases) sont également exprimées différemment par les neurones et les astrocytes. LDH-1, qui est généralement exprimé par les cellules utilisant le lactate, est fortement exprimé dans les neurones tandis que LDH-5, qui est plutôt exprimé dans les cellules produisant le lactate, est spécifiquement exprimé par les astrocytes (Magistretti et al., 2002).

L'entrée du glucose dans les cellules cérébrales se fait grâce à des transporteurs membranaires (GLUTs) qui facilitent la diffusion du glucose selon son gradient de concentration. L'expression de ces transporteurs est aussi différente selon les types cellulaires. GLUT1 est exprimé par les astrocytes et les cellules endothéliales alors que les neurones expriment GLUT3 (Brookes, 2005).

Bien que cette hypothèse d'un échange de lactate entre neurones et astrocytes (**figure 4**) soit encore débattue, car elle est basée soit sur des études théoriques soit sur des données *in vitro*, des études récentes donnent corps à cette hypothèse. Notamment, une étude réalisée sur des tranches aigues (Kasischke et al., 2004) a mis en évidence une compartimentalisation du métabolisme

énergétique entre astrocytes et neurones. Durant l'activation, un métabolisme oxydatif rapide et transitoire a lieu dans les neurones puis est suivi par un métabolisme glycolytique plus lent dans les astrocytes.

De plus, une récente étude *in vivo* montre que l'utilisation du glucose par les astrocytes suite à une activation neuronale est largement réduite dans des souris KO pour GLAST et GLT1 suggérant que la capture du glutamate est bien le signal qui engendre la capture et l'utilisation du glucose par les astrocytes (Voutsinos-Porche et al., 2003).

Finalement, deux études importantes ont montré, non seulement, que le glutamate induisait dans les astrocytes une stimulation de GLUT1, cent fois plus rapide que pour les autres types cellulaires (Loaiza et al., 2003), mais également, que le glutamate inhibait fortement le transport de glucose dans les neurones via une entrée sodique médiée par AMPA (Porras et al., 2004). Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse d'un transport de lactate entre les astrocytes et les neurones.

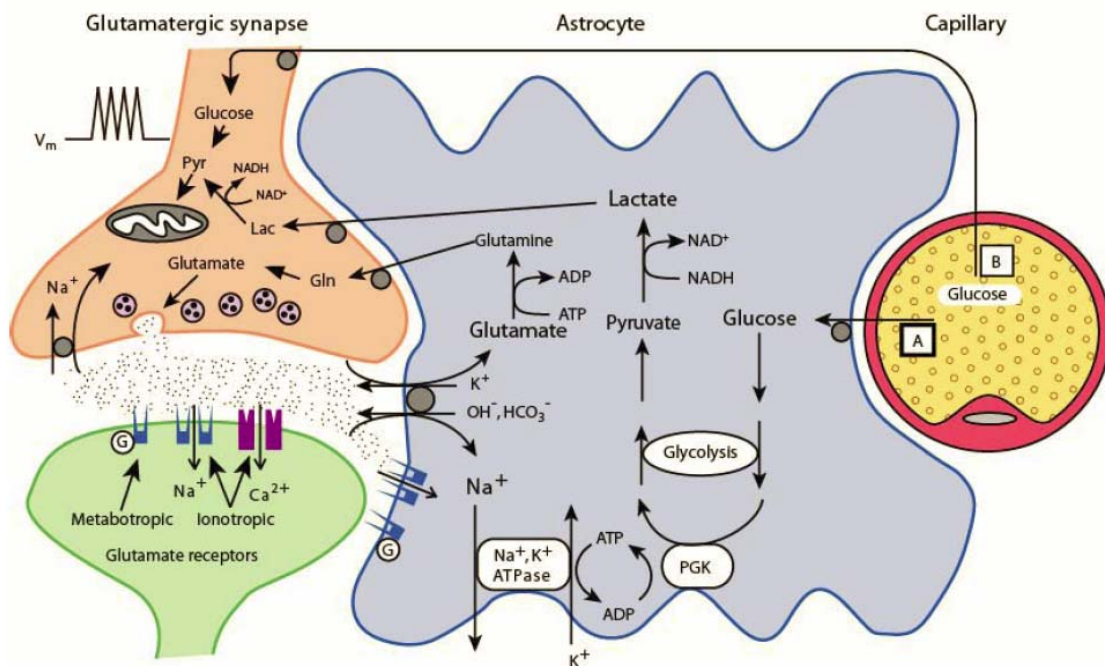


Figure 4.
Représentation schématique du couplage métabolique entre neurones et astrocytes lors de l'activité neuronale.

(D'après Pellerin and Magistretti, 1994)

Au niveau des synapses glutamatergiques, lors d'une stimulation, le glutamate est libéré dans la fente synaptique et active le neurone post-synaptique. L'action du glutamate prend fin lorsque celui-ci est recapté par les astrocytes avoisinants. Le glutamate est co-transporté dans les astrocytes avec le Na^+ augmentant ainsi la concentration sodique intracellulaire des astrocytes qui active la pompe Na^+/K^+ -ATPase. L'activation de cette pompe stimule à son tour la glycolyse, c'est-à-dire l'utilisation du glucose et la production de lactate. Le lactate libéré par les astrocytes peut alors être capté par les neurones et utilisé comme substrat énergétique.

1.2.2.2. Couplage neuro-vasculaire

Si les astrocytes permettent de fournir des substrats énergétiques aux neurones lors de l'activité synaptique, ils sont également capables de moduler le flux sanguin afin d'augmenter la quantité de glucose à leur disposition (Gordon et al., 2007; Iadecola and Nedergaard, 2007).

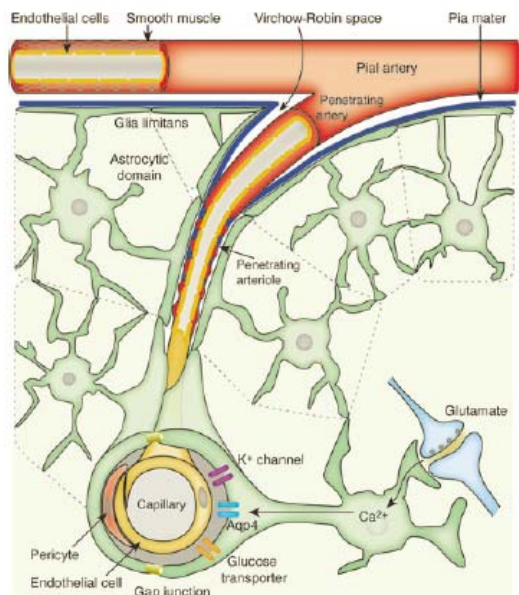


Figure 5. Position stratégique des astrocytes entre la vasculature cérébrale et les neurones.

(D'après Iadecola and Nedergaard, 2007)

Le système vasculaire cérébral est isolé du cerveau par la barrière hématoencéphalique. Les artères restant en surface sont couvertes par la glie limitans, alors que des artérioles pénètrent plus en profondeur et sont couvertes dans leur intégralité par les pieds vasculaires des astrocytes. Les astrocytes expriment au niveau de ces structures des protéines spécialisées comme les transporteurs du glucose, des canaux potassiques ou l'aquaporin4. Stimulés lors de l'activité synaptique, les astrocytes sont capables de transporter le glucose et de moduler le flux sanguin.

La stimulation des neurones provoque la vasodilatation des vaisseaux sanguins précédée par une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des astrocytes en contact avec ces vaisseaux (Zonta et al., 2003b). Grâce à l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques, il a été montré que ces deux événements étaient dépendants de l'activation des mGluRs (récepteurs métabotropiques du glutamate) astrocytaires qui provoque la production de substances vasodilatatrices qui ont été identifiées comme des produits de cyclo-oxygénases (Bezzi et al., 1998; Sanzgiri et al., 1999; Zonta et al., 2003b; Zonta et al., 2003a). Une autre étude a montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ pouvait également conduire à une vasoconstriction via la production d'acide arachidonique (AA) qui stimule la libération de vasoconstricteurs par les cellules endothéliales (Mulligan and MacVicar, 2004). Une étude récente (Gordon et al., 2008) a montré que la capacité des astrocytes à induire la vasodilatation plutôt que la vasoconstriction dépendrait de l'état métabolique du cerveau (**figure 6**). L'activation des astrocytes peut pareillement conduire à la vasoconstriction ou à la vasodilatation et c'est, en fait, la disponibilité en oxygène qui oriente vers l'une ou l'autre. Lorsque la disponibilité en oxygène est forte, les astrocytes induisent une vasoconstriction via la libération de l'AA. Lorsque la disponibilité en oxygène est diminuée lors d'une forte activité neuronale, la glycolyse et la libération de lactate par les astrocytes sont au maximum. Le lactate externe limite alors la capture de la prostaglandine E_2 (PGE_2), conduisant à l'accumulation de celle-ci. L'accumulation de la PGE_2 dans le milieu extracellulaire provoque la vasodilatation. La faible disponibilité en oxygène induit également une libération d'adénosine qui inhibe l'effet vasoconstricteur de l'AA permettant le passage de la vasoconstriction à la vasodilatation.

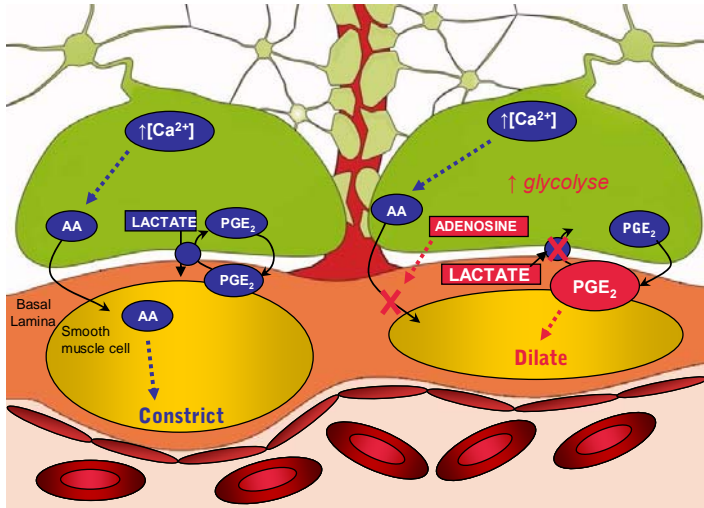


Figure 6. Représentation schématique de l'implication des astrocytes dans le couplage vasculaire.

(Adapté de Gordon et al., 2007; Gordon et al., 2008)

Lorsque la disponibilité en oxygène est suffisante (à gauche), les astrocytes libèrent l'AA qui a un effet vasoconstricteur. La PGE₂ est produite mais recapturée par cotransport avec le lactate. Lorsque la disponibilité en oxygène baisse (à droite), l'adénosine accumulée inhibe l'effet vaso-constricteur de l'AA et le lactate produit en grande quantité inhibe la recapture de la PGE₂ qui a un effet vasodilatateur.

1.2.3. Modulation de la transmission glutamatergique

Les astrocytes jouent également un rôle plus intégratif en modulant l'activité synaptique (Volterra and Meldolesi, 2005; Haydon and Carmignoto, 2006). Une première façon de moduler l'activité synaptique peut se faire via l'activité des transporteurs du glutamate exprimés au niveau des processus astrocytaires pérисynaptiques. En fixant et en internalisant le glutamate, ces transporteurs contrôlent de manière dynamique le niveau de glutamate et donc sa capacité à activer ou désensibiliser les récepteurs glutamatergique synaptiques et extrasynaptiques. Ils contrôlent également sa diffusion vers les synapses et les cellules gliales voisines (Bergles and Jahr, 1998; Rusakov and Kullmann, 1998)(Figure 7).

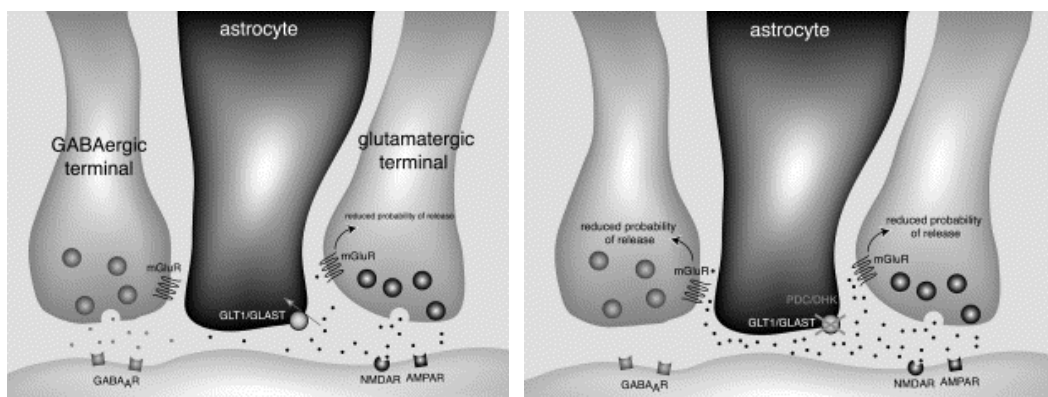


Figure 7. Modulation de la transmission glutamatergique par les astrocytes : capture du glutamate.

(D'après Piet and Jahr, 2007). Les transporteurs du glutamate des astrocytes contrôlent l'élimination du glutamate de l'espace extracellulaire et par conséquent le niveau d'activation des mGluRs présynaptiques. A gauche : Lors de l'activité synaptique, le glutamate libéré par les terminaisons neuronales exerce un rétrocontrôle inhibiteur de sa propre libération grâce à l'activation des mGluRs III. Les transporteurs astrocytaires du glutamate (notamment GLT-1) empêchent la diffusion du glutamate. Dans ces conditions, le glutamate ne peut atteindre les mGluRs situés sur une terminaison inhibitrice voisine. A droite : Lorsque le transport astrocytaire du glutamate est bloqué, le glutamate s'accumule dans l'espace extracellulaire, augmente le niveau d'activation des mGluRs des terminaisons excitatrices et réduit ainsi la probabilité de libération du glutamate. De plus, le glutamate peut diffuser et diminuer la libération de GABA par l'activation des mGluRs situé sur une terminaison inhibitrice voisine.

Comme la présence astrocytaire diffère d'une synapse à une autre (Ventura and Harris, 1999), ce mode de contrôle est spécifique à chaque synapse. Les conséquences fonctionnelles de ce type de contrôle dépendent de la distribution réciproque des transporteurs et des récepteurs du glutamate en fonction de l'arrangement morphologique des astrocytes autour des synapses (Rusakov and Lehre, 2002). L'arrangement des processus astrocytaires autour des synapses n'est, par ailleurs, pas statique et une modification dynamique de la morphologie astrocytaire, induite par certaines conditions, peut engendrer une modulation synaptique (Oliet et al., 2001).

Des études récentes ont montré que la modulation synaptique associée à la plasticité morphologique des astrocytes ne dépend pas seulement de la variation de la localisation des transporteurs du glutamate mais, également, de la variation des sites de libération des gliotransmetteurs (Panatier et al., 2006). La seconde façon que les astrocytes ont de moduler l'activité synaptique est, en effet, de libérer des substances neuro-actives comme le glutamate. Le glutamate est libéré, par les astrocytes, lors de l'activité neuronale, en direction des récepteurs neuronaux localisés soit sur les terminaisons axonales soit sur les dendrites, exerçant, dans les deux cas, un type différent de modulation (**Figure 8**).

Au niveau des cellules granulaires de la voie perforante du gyrus denté, les astrocytes de la couche moléculaire externe sont stimulés par l'activité synaptique qui provoque une élévation de leur $[Ca^{2+}]_i$ et conduit à la libération du glutamate par exocytose de petites vésicules (synaptic like microvesicles, SLMVs). Le glutamate astrocytaire est libéré au niveau présynaptique à proximité des récepteurs NMDA contenant une sous-unité NR2B. L'activation de ces récepteurs permet d'augmenter la libération de neurotransmetteurs et contribue au renforcement de la transmission synaptique (Jourdain et al., 2007). Au niveau ultrastructurel, il a été montré que les terminaisons neuronales de la couche moléculaire exprimaient les sous-unités NR2B de manière particulièrement forte au niveau des parties extrasynaptiques faisant face aux processus astrocytaires contenant les SLMVs (Jourdain et al., 2007). La distance séparant les sous-unités NR2B neuronales des SLMVs astrocytaires est, dans la majorité des cas, similaire à celle séparant les récepteurs post-synaptiques des vésicules synaptiques des zones actives présynaptiques (Gitler et al., 2004). Cette proximité suggère que l'information portée par la libération du glutamate par les astrocytes pourrait parvenir intacte (sans diffusion du signal) et rapidement aux terminaisons neuronales, permettant ainsi un mode de communication privilégié entre les astrocytes et les synapses.

Dans une autre région de l'hippocampe, la région CA1, les astrocytes du stratum radiatum sont, de la même façon, stimulés par l'activité synaptique des afférents collatéraux de Schaffer qui provoque une élévation de leur $[Ca^{2+}]_i$ et conduit à la libération du glutamate. Néanmoins, dans ce cas, le glutamate astrocytaire agit sur les récepteurs NMDA dendritiques. L'activation de ces récepteurs induit de larges SICs (slow inward courants) des cellules pyramidales et induit leur dépolarisation (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Perea and Araque, 2005). Les astrocytes peuvent induire la formation de ces SICs dans plusieurs cellules pyramidales voisines, avec une parfaite corrélation temporelle, ce qui semble être la cause de leur dépolarisation synchrone. La génération de SICs synchrones semble ne dépendre que d'un seul épisode de libération du glutamate par un seul astrocyte qui pourrait activer les différentes cellules pyramidales présentes dans son

territoire (Halassa et al., 2007). L'induction de SICs par les astrocytes a également été observée dans d'autres régions, comme le thalamus et le noyau accumbens (Parri et al., 2001; D'Ascenzo et al., 2007).

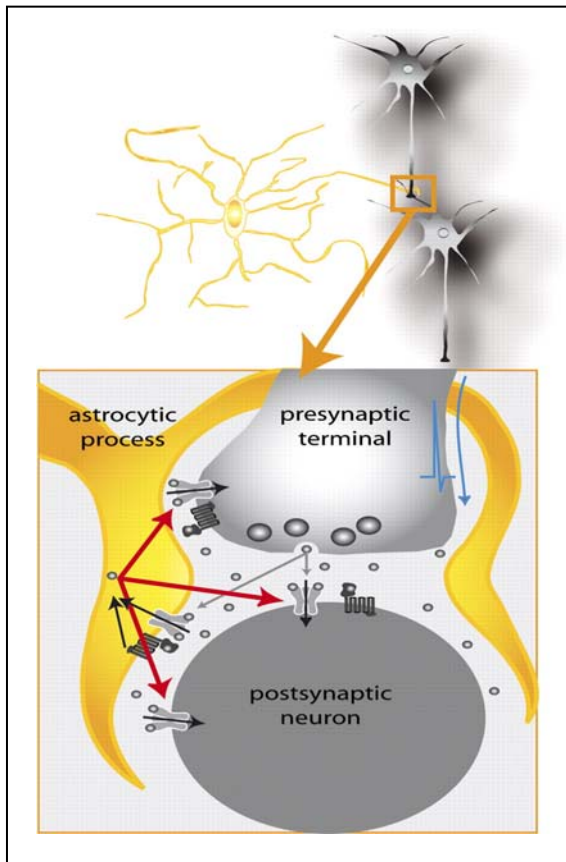


Figure 8.
Modulation de la transmission glutamatergique par les astrocytes : libération du glutamate.

(D'après Theodosis et al., 2008).

Le glutamate libéré lors de l'activité synaptique (flèches grise) active les récepteurs ionotropiques et métabotropiques des astrocytes. Ces récepteurs activent différentes voies de signalisation intracellulaire (flèches noires) qui conduisent à la libération de glutamate par les astrocytes (flèches rouges) qui agit sur les récepteurs pré ou postsynaptiques des neurones glutamatergiques.

Une potentiation de l'activité synaptique a également été observée, dans la même région de l'hippocampe, suite à la libération de glutamate par les astrocytes et à l'activation des mGluRs présynaptiques (Perea and Araque, 2007). L'inhibition de cette modulation astrocytaire par des bloqueurs de l'exocytose et sa dépendance au calcium suggère que le glutamate puisse être libéré par sécrétion régulée. De manière intéressante, cette augmentation transitoire de l'efficacité synaptique induite par les astrocytes peut être prolongée lorsque la stimulation astrocytaire et la dépolarisation post-synaptique sont corrélées temporellement. Cette prolongation de la modulation semble donc suggérer que les astrocytes pourraient être, également, impliqués dans les processus de mémoire.

Un type similaire de modulation a, également, été démontré au niveau des synapses inhibitrices des interneurons GABAergiques. La modulation astrocytaire est responsable de la potentialisation du signal inhibiteur observé lors d'une dépolarisation répétitive des interneurons (Kang et al., 1998). L'activité des interneurons stimule les récepteurs GABA_B des astrocytes, qui provoque une élévation de leur $[Ca^{2+}]_i$ et conduit à la libération du glutamate. Il est probable que le glutamate astrocytaire induise une potentialisation des interneurons en activant leur récepteurs glutamatergiques (Liu et al., 2004a).

1.3. Les astrocytes : cellules sécrétrices spécialisées

1.3.1. Les astrocytes synthétisent et libèrent des substances neuro-actives

L'existence d'un système de communication, basé sur la libération de gliotransmetteurs, entre les astrocytes et les autres cellules du cerveau a d'abord été suggérée à la fin des années 1980 suite à la découverte que les astrocytes étaient capables de contenir, de synthétiser et de libérer un large spectre de molécules (Martin, 1992). Les astrocytes sont, en effet, capables de synthétiser et de libérer un grand nombre de transmetteurs chimiques parmi lesquels des (i) acides aminés excitateurs et inhibiteurs (glutamate, GABA, aspartate, D-serine, acide homocystéique, acide quinolinique, glycine, taurine, etc.), (ii) d'autres neurotransmetteurs classiques (acetylcholine, noradrénaline, dopamine, sérotonine, histamine, etc.), (iii) différents ribonucléotides (ATP, GTP et leurs dérivés diphosphates et monophosphates, UTP) et nucléosides (adénosine et guanosine), (iv) des eicosanoïdes et différents médiateurs lipidiques (produits de la cyclo-oxygénase comme les prostaglandines, de la lipo-oxygénase et de l'épo-oxygénase), (v) des neuropeptides (proenképhaline, angiotensinogène, endothéline), (vi) des neurotrophines (NGF, neurotrophin-3, BDNF), (vii) des cytokines (IL, IFN, $TNF\alpha$), (viii) des chemokines et des facteurs de croissances (Bezzi et al., 1998; Medhora and Harder, 1998; Sanzgiri et al., 1999; Fields and Stevens, 2000; Hussy et al., 2000; Snyder and Ferris, 2000; Bergami et al., 2008; Blum et al., 2008; Kang et al., 2008; Liu et al., 2008; Fujita et al., 2009).

Pour la plupart de ces molécules, les mécanismes de libération ainsi que la dynamique de leur libération ne sont pas connus. Pour les eicosanoïdes, par exemple, il a été montré que tous les types de cellules gliales possédaient la machinerie enzymatique pour synthétiser l'acide arachidonique et ses métabolites. Les enzymes COX, LOX et EPOX sont exprimées, de manière constitutive, dans les astrocytes en culture et leur activité augmente avec les élévations calciques intracellulaires et leur formation est stimulée par des ligands endogènes. Néanmoins, seulement quelques études ont porté sur leurs dynamiques : les eicosanoïdes sont rapidement libérés après une stimulation des récepteurs couplés à la protéine G (GPCRs ; Bezzi et al., 1998; Bezzi et al., 2001) d'une façon pulsatile (Zonta et al., 2003a) mais le mécanisme exact et les sites d'action des prostaglandines n'ont pas été complètement explorés. De la même façon, il est connu que les cytokines et les chemokines sont produites dans le cerveau en réponse à un stimulus pathophysiologique et qu'elles participent à l'inflammation. Mais, le fait que ces molécules puissent participer à un processus physiologique, comprenant une communication rapide en interaction avec la transmission synaptique, reste largement inexploré. Récemment, il a été montré que le $TNF\alpha$ pouvait être libéré par les astrocytes en réponse à un stimulus physiologique (SDF-1 α ; Bezzi et al., 2001) de manière assez rapide (quelques secondes). Les acides aminés libérés par les astrocytes ont particulièrement retenu l'attention des groupes de recherche. Ainsi, durant ces 15 dernières années, différents mécanismes de libération des acides aminés ont été décrits (Malarkey and Parpura, 2008; Cali et al., 2009).

1.3.2. Mécanismes de libération des acides aminés par les astrocytes

1.3.2.1. Mécanismes de libération calcium indépendants

Les mécanismes de libération des acides aminés par les astrocytes, qui ont été les premiers décrits, sont ceux qui sont indépendants du calcium. Parmi ceux-ci, on peut notamment citer : (i) les canaux sensibles aux changements de volume de la cellule (Kimelberg et al., 1990; Mongin and Kimelberg, 2002; Haskew-Layton et al., 2008), (ii) les hémicanaux (Cotrina et al., 1998; Stout et al., 2002; Ye et al., 2003), (iii) les récepteurs P2X7 (Kukley et al., 2001; Duan et al., 2003), (iv) l'inversion des transporteurs membranaires (Szatkowski et al., 1990; Attwell et al., 1993; Volterra et al., 1996; Longuemare and Swanson, 1997; Rossi et al., 2000; Re et al., 2006) ou (v) l'échange par le transporteur cystine/glutamate (Bender et al., 2000; Allen et al., 2001; Shanker and Aschner, 2001; Baker et al., 2002; Moran et al., 2003; Tang and Kalivas, 2003; Moran et al., 2005).

Le gonflement des astrocytes stimule la libération d'osmolytes via des canaux sensibles au volume. De manière intéressante, ces osmolytes comprennent des acides aminés comme la taurine, l'aspartate et le glutamate (Kimelberg et al., 1990). Cette libération peut donc avoir deux effets : elle permet de diminuer le volume de la cellule tout en informant les cellules avoisinantes. Cette libération peut avoir lieu soit dans des conditions physiologiques et sert alors de régulation, soit, plus probablement, dans des conditions pathologiques comme un trauma, une ischémie ou une encéphalopathie hépatique et contribue alors aux dommages cérébraux. Le mécanisme qui relie la variation du volume à l'ouverture des canaux et à la libération des osmolytes n'est toujours pas complètement défini. La plupart des études indiquent que ce phénomène est indépendant du calcium.

L'inversion des transporteurs peut également être mise en jeu lors de conditions pathologiques. Dans certaines conditions, ces transporteurs peuvent inverser leur fonctionnement et ainsi pomper les transmetteurs hors de la cellule et permettre une libération indépendante du calcium et non vésiculaire des transmetteurs ainsi qu'une communication intercellulaire (Attwell et al., 1993). Des preuves directes d'une inversion des transporteurs ont été réunies pour le GABA et le glutamate à la fois au niveau des neurones et des cellules gliales. Les transporteurs du glutamate échangent une molécule de glutamate avec deux Na^+ contre un K^+ et un OH^- ou alors contre un K^+ seul mais dans ce cas, un H^+ est également transporté avec le glutamate. Attwell et ses collaborateurs ont démontré que le transport du glutamate pouvait être inversé quand le K^+ externe augmentait de manière significative et lorsqu'il y avait suffisamment de sodium et de glutamate présents dans la cellule pour permettre cette inversion (Szatkowski et al., 1990).

Les acides aminés peuvent donc être libérés de différentes manières, selon différentes conditions, probablement à différents endroits et avec des modalités différentes (Vesce et al., 2007). Le glutamate, par exemple, pourrait être libéré par chacun des mécanismes cités précédemment (Malarkey and Parpura, 2008 ; **figure 9**).

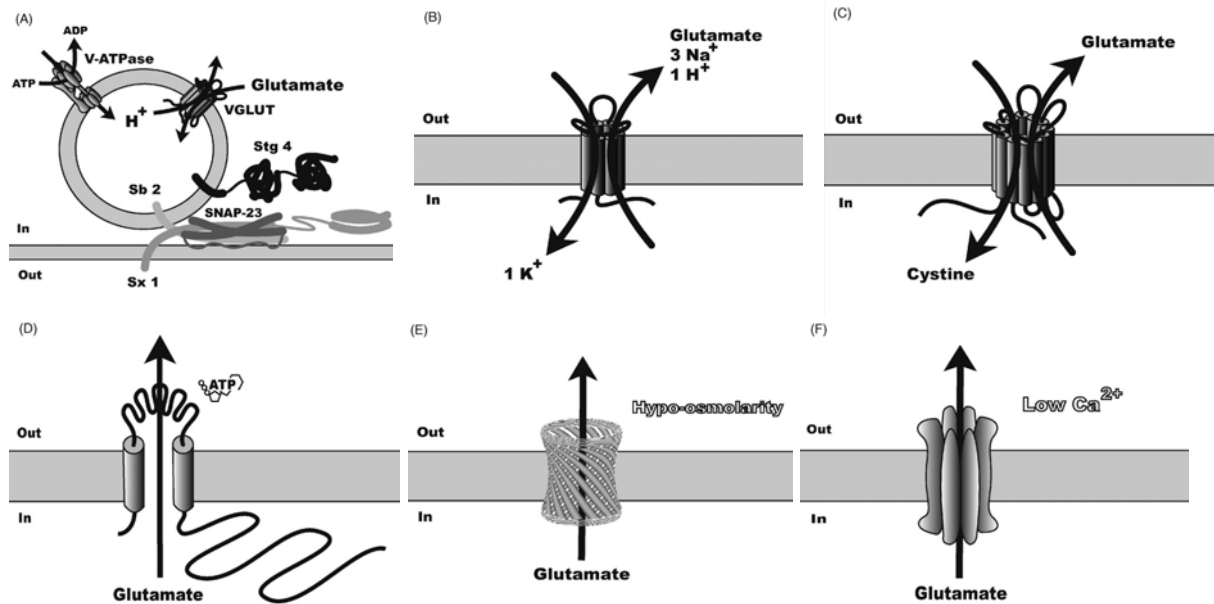


Figure 9. Différents mécanismes de libération du glutamate. (D'après Malarkey and Parpura, 2008). (A) Exocytose Ca^{2+} -dépendante, (B) inversion des transporteurs membranaires, (C) échange par le transporteur cystine/glutamate, (D) libération par les récepteurs purinergiques ionotropiques, (E) ouverture des canaux sensibles aux changements de volume de la cellule, (F) libération par les hémicanaux.

1.3.2.2. Mécanismes dépendants du calcium intracellulaire

Parmi tous les gliotransmetteurs, le glutamate est, de loin, le plus documenté. Le travail de Parpura et de ses collaborateurs, en 1994, a conduit à la première description d'un mécanisme de libération du glutamate dépendant du calcium dans les astrocytes (Parpura et al., 1994). Ce travail décrit une libération du glutamate, par les astrocytes en culture, qui possède, apparemment, des propriétés très différentes des processus jusqu'alors décrits comme l'inversion des transporteurs ou la libération induite par un changement de volume de la cellule (Attwell et al., 1993). Parmi ces propriétés particulières, il faut noter une activation par des ligands endogènes via les GPCRs ainsi qu'une dépendance aux élévations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Par la suite, des études pharmacologiques ont montré l'autonomie de ce type de libération, qui peut avoir lieu indépendamment des autres types de libération du glutamate. Après ces premières observations, il était essentiel que des études similaires soient réalisées sur des préparations plus physiologiques de façon à déterminer si ce phénomène représentait une forme physiologique de libération du glutamate ou seulement une particularité des astrocytes en culture. Des études d'imagerie ainsi que des dosages enzymatiques du glutamate sur des tranches aigües d'hippocampe ont complété cette démonstration de l'existence d'une libération du glutamate calcium dépendante par les astrocytes (Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Bezzi et al., 2001). Plus récemment, un grand nombre d'études ont confirmé ces observations initiales et supportent fortement l'existence d'une libération du glutamate calcium dépendante induite par l'activation des différents GPCRs, comme les mGluRs (Bezzi et al., 2004) ou les récepteurs purinergiques (Domercq et al., 2006). Il semble également que ce type de libération requiert la

libération du calcium des réserves internes (Sanzgiri et al., 1999; Jeremic et al., 2001; Kang et al., 2005; Takano et al., 2005).

En 2001, il a été montré, qu'en plus des transmetteurs classiques comme le glutamate ou l'ATP, certaines substances, comme la chemokine CXCL12, pouvaient induire la libération du glutamate grâce à une activation directe du récepteur CXCR4 (Bezzi et al., 2001). Deux observations intéressantes ont été faites concernant cette libération. La première est que la libération du glutamate induite par le CXCL12 semble faire partie d'une longue chaîne d'événements intra et intercellulaires mettant en jeu deux médiateurs chimiques : le $TNF\alpha$ et les prostaglandines. La seconde est que ce processus est sensible aux inhibiteurs de l'exocytose neuronale comme les toxines clostridiales (toxine tétanique et botulique) et à la bafilomycine A1, un bloqueur de la pompe vésiculaire H^+ -ATPase (Bezzi et al., 1998; Araque et al., 2001; Bezzi et al., 2001; Pasti et al., 2001; Domercq et al., 2006). Ces observations suggèrent de fortes similitudes avec la neurosécrétion. A ce moment, cependant, il n'était pas encore tout à fait certain qu'un processus d'exocytose supporte la libération du glutamate par les astrocytes.

1.3.3. Exocytose régulée de gliotransmetteurs par les astrocytes

Ces 10 dernières années, de nombreuses preuves ont été réunies et suggèrent que le glutamate et certains autres gliotransmetteurs comme la D-serine, l'ATP, le NPY, l'ANP et le proBDNF (Mothet et al., 2005; Pangrsic et al., 2007; Zhang et al., 2007; Bergami et al., 2008; Martineau et al., 2008; Pryazhnikov and Khiroug, 2008; Ramamoorthy and Whim, 2008) peuvent être libérés, par les astrocytes, grâce à un processus d'exocytose régulée. Ce processus ayant été plus largement étudié pour le glutamate que pour les autres gliotransmetteurs, ce paragraphe portera surtout sur la libération du glutamate.

Jusqu'à très récemment, il n'existait pas de preuve directe de l'existence d'un processus d'exocytose régulée dans les astrocytes. Des études pharmacologiques utilisant des bloqueurs comme la toxine tétanique ou la toxine botulique qui interfèrent spécifiquement avec l'exocytose neuronale ont permis de montrer que la libération du glutamate calcium dépendante était également bloquée par ces inhibiteurs tant en culture qu'en tranches aigues (Jeftinija et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Bezzi et al., 2001; Pascual et al., 2001; Pasti et al., 2001). Il est logique de penser que, si ces toxines bloquent la libération du glutamate, alors les astrocytes doivent exprimer les protéines qui sont les substrats de ces toxines. Dans les neurones, le complexe protéique de base qui est responsable de l'exocytose est formé de trois protéines essentielles : une protéine vésiculaire, la synaptobrevin II et deux protéines membranaires, la syntaxin I et la SNAP-25 (Sudhof, 2004; Jahn and Scheller, 2006). Les astrocytes expriment ces trois types de protéines : la synaptobrevin II ainsi que son homologue la cellubrevine, la syntaxin I et la SNAP-23, un isoforme de la SNAP-25 (Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007). Les astrocytes, au moins en culture, peuvent également exprimer d'autres protéines impliquées dans l'exocytose neuronale comme la synaptotagmin I, la synapsin I et rab3a (Parpura et al., 1995; Madison et al., 1996; Jeftinija et al., 1997; Calegari et al., 1999; Hepp et al., 1999; Maienschein et al., 1999; Anlauf and Derouiche, 2005).

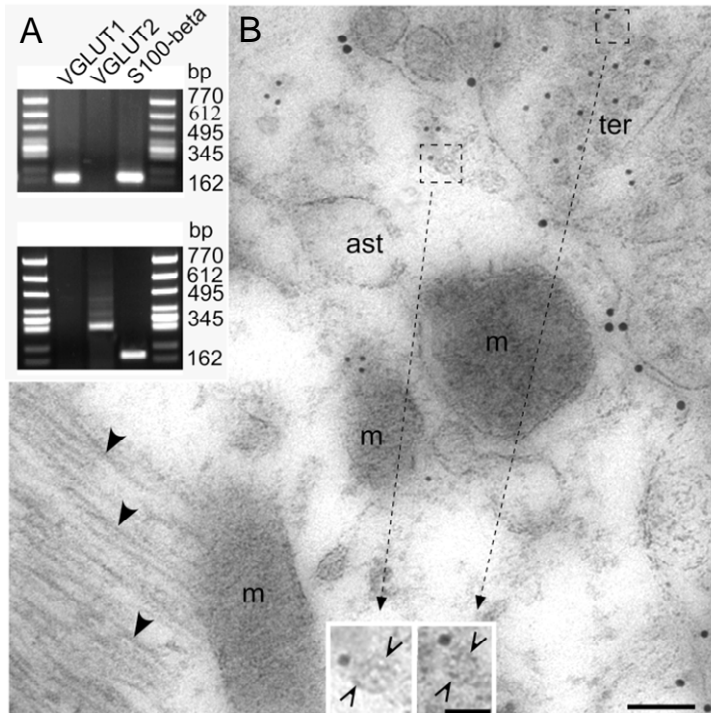


Figure 10.
Les SLMVs glutamatergiques des astrocytes.
(D'après Bezzi et al., 2004).

A. Les astrocytes expriment VGLUT1 et VGLUT2 (cDNA obtenus par single cell RT-PCR). **B.** Expression des VGLUTs *in situ* observé par microscopie électronique. Ces transporteurs sont présents (billes de petite taille sur la microscopie électronique) dans les astrocytes (identifié par un marquage de transporteurs membranaires du glutamate, billes de grande taille sur la microscopie électronique ainsi que par la présence des filaments (flèches pleines)). Ils sont exprimés sur des vésicules de petite taille (30-50nm) proches de la membrane plasmique et faisant face à une terminaison glutamatergique. Les agrandissements soulignent la similitudes entre les SLMVs des astrocytes (à gauche) et les SVs des neurones (à droite).

De façon similaire, l'inhibition de la libération du glutamate par la bafilomycine A1 (BafA1) semble suggérer que les astrocytes possèdent un compartiment intracellulaire capable d'accumuler le glutamate avant la libération. La Baf A1 bloque la pompe H^+ -ATPase provoquant une alcalinisation des vésicules, supprimant le gradient H^+ nécessaire au cotransport du glutamate par les transporteurs vésiculaires (vesicular glutamate transporter ou VGLUTs) et empêchant par conséquent toute accumulation du glutamate dans les vésicules. L'expression des VGLUTs (1,2 et 3) a été montrée dans les astrocytes en culture, fraîchement isolés et *in vivo* (Bezzi et al., 2004; Kreft et al., 2004; Montana et al., 2004; Zhang et al., 2004b). Cette expression des VGLUTs suggère donc que les astrocytes possèdent un compartiment vésiculaire capable d'accumuler le glutamate et de le libérer par exocytose. Ce compartiment vésiculaire a ensuite été identifié par microscopie électronique et possède une morphologie similaire aux vésicules synaptiques (**figure 10**). Les vésicules astrocytaires ont été observées en culture et *in situ*, elles sont groupées à proximité de la membrane plasmique (environ 100nm), ont une apparence claire (non dense aux électrons) en microscopie électronique, un petit diamètre (environ 30 à 50 nm) et expriment les protéines responsables de la capture du glutamate (VGLUTs) et de la fusion comme la cellubrevine. Toutes ces caractéristiques ont permis de classer ces vésicules astrocytaires comme des SLMVs (Thomas-Reetz and De Camilli, 1994; Bezzi et al., 2004; Bergersen and Gundersen, 2009). Contrairement aux terminaisons synaptiques qui présentent une forte accumulation de vésicules, les processus astrocytaires présentent des vésicules plus clairsemées (Nedergaard et al., 2002). Les astrocytes hippocampaux, par exemple, contiennent des groupes d'une dizaine de vésicules faisant face le plus souvent aux récepteurs NMDA extrasynaptiques des dendrites ou aux récepteurs NMDA présynaptique (Jourdain et al., 2007). Dans l'hippocampe, 57% des interfaces axones/épines est associé à des astrocytes (Ventura and Harris, 1999). La proximité des vésicules astrocytaires contenant des VGLUTs avec les récepteurs NMDA

neuronaux suggère que les astrocytes *in situ* pourraient donc libérer du glutamate de manière locale en direction des neurones. De plus, comme un seul astrocyte est en contact avec de très nombreux neurones (Bushong et al., 2002), ces cellules peuvent agir comme un lien entre différents neurones et transférer l'information entre réseaux neuronaux.

Les astrocytes possèdent donc un compartiment vésiculaire capable d'accumuler le glutamate et expriment les protéines nécessaires à la fusion de ces vésicules. Afin d'étudier si ces vésicules prennent effectivement part à la libération du glutamate, la fusion de ces vésicules a été étudiée par imagerie à onde évanescente (ou fluorescence à réflexion interne totale ; TIRF) grâce à un rapporteur fluorescent spécifique de ces vésicules (le VGluT2-eGFP) et un rapporteur fluorescent de la fusion (l'acridine orange) (Tsuboi et al., 2000; Steyer and Almers, 2001; Jahn et al., 2003; Bezzi et al., 2004). L'exocytose de ces vésicules est stimulée, dans les astrocytes corticaux en culture, par le (RS)-3,5-dihydrophenylglycine (DHPG), un agoniste spécifique des mGluRs du groupe I qui induit la libération calcium dépendante du glutamate par les astrocytes (Bezzi et al., 1998). La fusion des vésicules se produit en un burst (0,8-1s) concernant environ 30% des vésicules VGluT positives présentes dans le champ du TIRF représentant vraisemblablement les vésicules matures pour la fusion. De plus, ces événements de fusion sont bloqués par une pré-exposition des cellules aux inhibiteurs de la libération calcium dépendante du glutamate (chelateur du calcium intracellulaire, toxine tétanique, BafA1) suggérant que les événements de fusion des SLMVs exprimant les VGluTs observés dans cette étude représentent une composante de la libération du glutamate calcium dépendante décrite par Parpura en 1994. Les dynamiques très rapides de fusion observées dans cette étude révèlent que la libération rapide du glutamate n'est pas une caractéristique exclusive des neurones et apporte la première démonstration complète de l'existence d'une sécrétion régulée rapide dans les astrocytes.

1.4. La sécrétion régulée

Suite à cette première démonstration de l'existence d'une sécrétion régulée rapide dans les astrocytes, de nombreuses études ont confirmé cette observation (Dewey, 1986; Zhang et al., 2004a; Zhang et al., 2004b; Chen et al., 2005; Domercq et al., 2006; Bowser and Khakh, 2007; Nadrigny et al., 2007; Bergami et al., 2008; Li et al., 2008; Ramamoorthy and Whim, 2008). Néanmoins, les données obtenues sont loin d'apporter une description complète et cohérente des propriétés de cette sécrétion régulée. Le défi était si grand de pouvoir (enfin) donner aux astrocytes un statut de cellules sécrétrices spécialisées qui leur permettrait d'être les partenaires légitimes et incontournables des neurones dans le fonctionnement cérébral que peu de précautions ont été prises pour arriver à cette conclusion. Cette absence de précautions est en partie due au manque criant de données sur les composants de cette sécrétion et si elle ne remet pas en cause l'existence d'une sécrétion régulée, elle jette un large flou sur ses modalités et, par là même, sur l'importance fonctionnelle de cette sécrétion. La sécrétion régulée est, sur le papier, un processus assez simple : un stimulus externe provoque une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ à proximité de vésicules provoquant leur fusion avec la membrane plasmique libérant ainsi leur contenu dans l'espace extracellulaire. Le large spectre de stimuli pouvant entraîner la sécrétion, la diversité des compartiments intracellulaires pouvant réaliser cette sécrétion, les dynamiques plus ou moins rapides de ces compartiments, tant pour la maturation, que pour la fusion et le recyclage, les composants du couplage stimulus/sécrétion ainsi que leurs dynamiques en font, en réalité, un processus des plus complexes. Lorsque l'on regarde le travail fourni qu'il a fallu mener pour obtenir, sinon un tableau complet et définitif, du moins une description cohérente et détaillée de la neurosécrétion ou de la sécrétion régulée des cellules endocrines, il est évident qu'il nous faudra nous armer de patience et de rigueur pour obtenir une telle description de la sécrétion astrocytaire.

1.4.1. Les différentes voies de sécrétion régulée

La première difficulté à résoudre est de séparer clairement les participations respectives des différentes voies de sécrétion régulée. Différents types d'organelles ont été proposés comme acteurs de la libération de gliotransmetteurs : des SLMVs (Bezzi et al., 2004; Crippa et al., 2006; Jourdain et al., 2007) aux DCGs (Coco et al., 2003; Striedinger et al., 2007; Ramamoorthy and Whim, 2008) en passant par les lysosomes (Zhang et al., 2007; Li et al., 2008) ainsi que des organelles extra-larges de plusieurs micromètres de diamètre (Xu et al., 2007). Néanmoins, la plupart des études sur la gliotransmission n'avait pas anticipé cette diversité des compartiments intracellulaires pouvant réaliser la sécrétion et, en utilisant des marqueurs génériques de l'exocytose, n'a pu être en mesure de distinguer la contribution des différentes populations. Cet enregistrement simultané des signaux de fusion de différentes populations a conduit à des incohérences significatives concernant les propriétés et les dynamiques de l'exocytose astrocytaire (Bezzi et al., 2004; Chen et al., 2005; Bowser and Khakh, 2007; Jaiswal et al., 2007). Ainsi la description de la sécrétion astrocytaire proposée suite à ces études (Chen et al., 2005; Bowser and Khakh, 2007; Jaiswal et al., 2007; Nadrigny et al., 2007;

Xu et al., 2007) ne peut être considérée comme définitive puisqu'elle mélange la contribution de différentes populations.

De manière générale, les deux principales classes d'organelles réalisant la sécrétion sont les SLMVs/SVs et les DCGs (Thomas-Reetz and De Camilli, 1994; Kasai et al., 1999; Martin, 2003).

Les vésicules de petite taille (~50nm), non denses aux électrons en microscopie électronique, sont d'abord connues comme vésicules synaptique (SVs) puisqu'elles ont d'abord été décrites dans les terminaisons synaptiques des neurones où elles sont les plus nombreuses. Elles contiennent des neurotransmetteurs qu'elles accumulent grâce à la pompe H⁺/ATPase et à des transporteurs vésiculaires. Elles sont équipées pour la fusion et réalisent la sécrétion synaptique dont les dynamiques sont particulièrement rapides. Elles sont capables de réaliser plusieurs fusions de suite grâce à des modalités de fusion comme le « kiss and run » ainsi qu'un recyclage local. Elles sont divisées en différents groupes en fonction de leur maturation et de leur aptitude à fusionner suite à une stimulation. Des vésicules de taille et d'apparence similaires (les « synaptic like microvesicles » ou SLMVs) ont également été décrites dans des cellules non neuronales (Thomas-Reetz and De Camilli, 1994). Outre la taille et l'apparence, elles possèdent beaucoup de propriétés communes avec les SVs. Elles possèdent également l'équipement pour accumuler les neurotransmetteurs (pompe H⁺/ATPase et transporteurs vésiculaires) ainsi que l'équipement protéique nécessaire à la fusion (Llona, 1995; Moriyama et al., 1996). De manière générale, ces vésicules présentent une sécrétion assez rapide et de courte durée (Kasai et al., 1999), impliquant un groupe de vésicules prêt à fusionner, un recyclage local et rapide et une majorité de fusion impliquant le « kiss and run » (Gerber and Sudhof, 2002; Martin, 2003; MacDonald et al., 2005).

Concernant les astrocytes, il a été montré que leurs SLMVs possédaient bien l'équipement nécessaire au stockage du glutamate et à la fusion (Bezzi et al., 2004; Bergersen and Gundersen, 2009), qu'elles réalisaient une sécrétion rapide et de courte durée du glutamate (quelques centaines de ms ; Bezzi et al., 2004) . Elles semblent également impliquées dans la sécrétion de la D-serine (Mothet et al., 2005; Bergersen and Gundersen, 2009).

Les « large dense core granules » (DCGs) sont ainsi appelés car ils sont de taille plus grande que les SVs (~70-200nm) et qu'ils possèdent un cœur dense aux électrons lorsqu'ils sont visualisés en microscopie électronique. Contrairement aux SVs et aux SLMVs qui contiennent des éléments de faible poids moléculaire, les DCGs contiennent des protéines de la famille des granines comme les chromogranines et les sécrétogranines, ainsi qu'un large spectre de molécules actives comme des hormones et des transmetteurs peptidiques, l'ATP ou différentes amines. La diversité des DCGs rend difficile une description rapide de leurs composants (pour revue Meldolesi et al., 2004). Les DCGs sont formés et chargés de leur contenu au niveau de l'appareil de Golgi. De manière générale, leur sécrétion est plus lente et plus soutenue que celle des SVs et des SLMVs (Kasai, 1999; Martin, 2003; Meldolesi et al., 2004). Il semble, qu'avant la stimulation, la quantité de DCGs prêts à fusionner soit plus faible (voire absente) que pour les SVs et SLMVs. Leur modalité de sécrétion est majoritairement orientée vers la fusion totale du DCG ce qui implique un recyclage plus lent comprenant une endocytose nécessaire à la recapture des protéines membranaires spécifiques des DGCs qui ont été mélangées lors de la fusion avec les composants de la membrane plasmique et une reformation d'un

DCG mature à partir du Golgi. Néanmoins, il a été récemment observé que certains DCGs pouvaient mettre en jeu un processus similaire au « kiss and run » des SVs et permettre ainsi un recyclage local et rapide des composants des DCGs (Taraska et al., 2003).

Concernant les astrocytes, les DCGs ont été identifiés par Calegari en 1999 (Calegari et al., 1999) sur des cultures d'astrocytes hippocampaux par un marquage de la ségréto granin II (SgII). Différents sécrétagogues (ionomycine, dibutyryl-cAMP et bradykinine) induisent la libération de la SgII de manière calcium dépendante. Par la suite, il a été montré que ces DCGs pouvaient contenir et libérer l'ATP (Coco et al., 2003). Il a également été montré que les DCGs astrocytaire pouvaient libérer de manière calcium dépendante différents peptides comme le peptide natriurétique atrial (ANP ; Krzan et al., 2003) ou le neuropeptide Y (NPY ; Ramamoorthy and Whim, 2008).

Les lysosomes ont également été proposés comme acteurs de la sécrétion régulée des astrocytes. Pour autant, les lysosomes ne font pas partie des organelles supportant classiquement la sécrétion régulée dans les cellules sécrétrices spécialisées. Ils sont généralement considérés comme le point final du recyclage et de la dégradation des éléments extracellulaires ou membranaires endocytés. Dans certaines conditions ou dans certains types cellulaires particuliers, les lysosomes peuvent effectivement fusionner de manière calcium dépendante avec la membrane plasmique. Ce processus a surtout été impliqué dans l'inflammation, la réponse immunitaire, la différenciation tumorale, la réparation membranaire et la production ou la dégradation de matériel matriciel (Andrews, 2000; Reddy et al., 2001; Andrei et al., 2004; Trajkovic et al., 2006). L'exocytose des lysosomes présente des dynamiques relativement lentes par rapport à celles des SVs/SLMVs et des DCGs. Concernant les astrocytes, différentes études ont montré que les lysosomes pouvaient fusionner avec la membrane plasmique de manière calcium dépendante (Jaiswal et al., 2007; Li et al., 2008) et conduire à la libération d'ATP (Zhang et al., 2007).

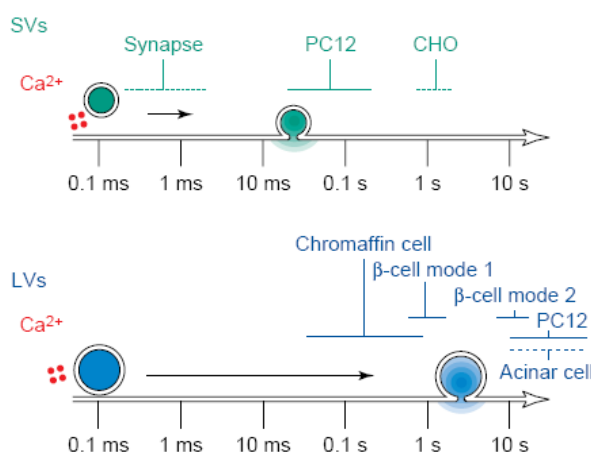


Figure 11. Dynamiques de la sécrétion régulée des selon le type d'organelle et le type cellulaire. (D'après Kasai et al., 1999). Les dynamiques des SVs sont majoritairement plus rapides (quasiment instantanées pour les vésicules synaptiques et quelques dizaines à quelques centaines de millisecondes pour les plus lentes) que celles des LVs (ou DCGs) (quelques centaines de millisecondes à plusieurs secondes).

La comparaison des données obtenues pour la sécrétion régulée des astrocytes avec celles obtenues pour les autres cellules sécrétrices (**Figure 11**) nous permet déjà de définir un cadre d'étude pour la suite. La relative conservation des propriétés de la sécrétion régulée pour les différents types d'organelles mis en jeu à travers les différents types cellulaires suggère que nous trouvons des propriétés comparables pour les astrocytes. Ainsi est-il logique de penser que les SLMVs seront plus facilement associés à une sécrétion suivant rapidement la stimulation et de courte durée, libérant de

petites molécules (comme le glutamate, la D-serine, le GABA, etc.) et les DCGs à une sécrétion retardée par rapport à la stimulation mais probablement plus soutenue, libérant des molécules comme l'ATP, certaines hormones ou des facteurs de croissance. La caractérisation des dynamiques exactes et des modalités des différentes voies de sécrétion est fondamentale pour en déterminer l'implication fonctionnelle (notamment leur interaction avec la neurotransmission). Par ailleurs, la compréhension des modalités de sécrétion, du type de molécules sécrétées et des acteurs moléculaires intervenant dans cette sécrétion est également nécessaire pour comprendre de quelle façon ces différentes voies de sécrétion peuvent être détournées lors de conditions pathologiques et conduire aux dommages cellulaires que l'on connaît.

1.4.2. Le couplage stimulus/sécrétion

La nature des organelles et leurs propriétés de sécrétion ne sont pas les seules données critiques pour définir la nature de la sécrétion. La capacité des cellules à former des arrangements structuraux et fonctionnels rendant le couplage entre le stimulus et la sécrétion plus ou moins efficace est, également, à prendre en compte. L'arrangement particulièrement complexe et structuré d'une synapse est, par exemple, essentiel pour un couplage efficace et rapide entre la stimulation et la libération des neurotransmetteurs. Celle-ci se produit moins d'une milliseconde après l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants provoquée par l'arrivée du potentiel d'action. Pour atteindre ce degré de synchronie entre la stimulation et la sécrétion, la vésicule doit se trouver suffisamment près d'un ou plusieurs canaux calciques. La distance entre la vésicule et les canaux calciques détermine de manière critique l'amplitude et la rapidité de la sécrétion (**Figure 12**). C'est pour cela que la compréhension de l'organisation spatiale entre les points d'entrée du calcium et les sites de fusion est fondamentale pour la compréhension de la nature de la sécrétion régulée astrocytaire.

Ainsi la grande différence entre la sécrétion régulée des cellules électriquement excitables et celles des cellules non excitables électriquement est que la première est induite par l'entrée de calcium extracellulaire à travers des canaux calciques voltage-dépendants alors que la seconde est induite par la libération du calcium des réserves intracellulaires (notamment le réticulum endoplasmique ou RE). Donc, contrairement à l'activation électrique, l'activation par un ligand endogène ne provoque pas directement l'entrée du calcium dans le cytosol, elle doit passer par la production de seconds messagers ce qui retarde d'autant le couplage stimulus/sécrétion. Par ailleurs, la position des canaux calciques voltage-dépendants sur la membrane plasmique, et donc à proximité des sites de fusion, semble plus propice à un couplage rapide entre le stimulus et la sécrétion que la position des canaux calciques sur le RE, a priori, plus éloigné des sites de fusion, puisque qu'en position interne dans la cellule. Il est évident que l'amplitude et la durée de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, la compétence à fusionner et la position des vésicules par rapport à la membrane ainsi que la sensibilité et la cinétique des senseurs du calcium sont des éléments à prendre en compte pour la compréhension du couplage stimulus/sécrétion. Néanmoins, sans une forte proximité entre les sites d'entrée du calcium (donc le RE dans le cas des astrocytes) et les sites de fusion, une sécrétion rapide suite à la stimulation n'est pas envisageable.

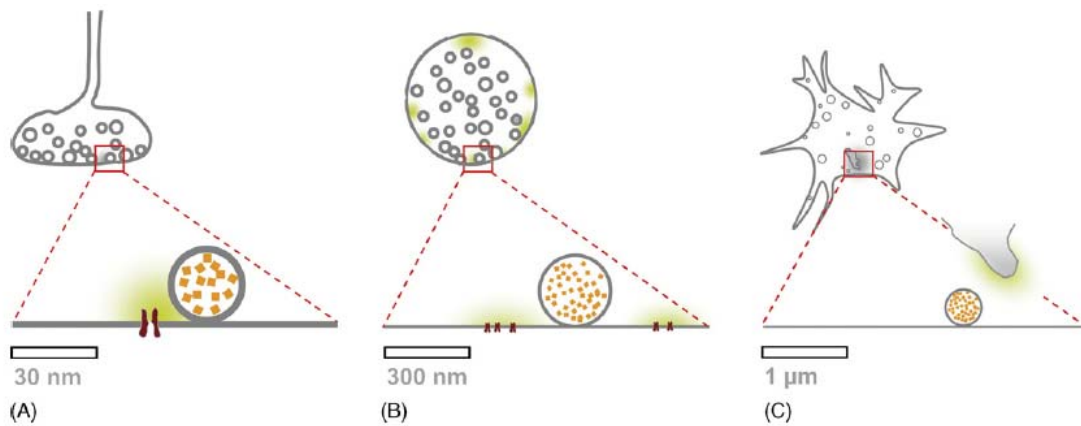


Figure 12.

Différents modèles de domaines calciques. (D'après Oheim et al., 2006).

A. Nanodomains synaptiques. Au niveau des synapses, le calcium entre à travers des canaux calciques voltage dépendants situés sur la membrane plasmique. La $[Ca^{2+}]_i$ à proximité des canaux calciques augmente fortement (jusqu'à plusieurs centaines de μM) et très rapidement lors de leur ouverture. La rapidité ($\sim 200 \mu s$) entre l'ouverture des canaux calciques et l'exocytose a permis de déduire la très grande proximité entre les canaux et les SVs (quelques dizaines de nanomètres). **B. Microdomaines calciques des cellules neuroendocrines.** Dans les cellules neuroendocrines, l'entrée du calcium se fait également à travers des canaux calciques voltage dépendants. Néanmoins les vésicules sont assez éloignées des sites d'entrée du calcium comme le montre la grande sensibilité de la sécrétion aux tampons calciques comme l'EGTA. Seule une faible partie des vésicules est à proximité des canaux calciques, ces vésicules peuvent fusionner assez rapidement suite à un seul potentiel d'action. Pour la grande majorité, les vésicules sont assez éloignées des sites d'entrée du calcium, leur fusion est donc retardée et nécessite une stimulation plus forte. **C. Microdomaines calciques des cellules non-excitables.** Dans les cellules non-excitables, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est due à la stimulation des GPCRs et à la libération de calcium du réticulum endoplasmique via la production d' IP_3 . Le couplage stimulus/sécrétion est plus lent dans ces cellules, avec un temps de latence assez long et des fusions assez éparpillées dans le temps.

Si les dynamiques de la sécrétion régulée des astrocytes semblent assez variables au vu des études réalisées, celles des SLMVs sont relativement rapides (quelques centaines de ms, Bezzi et al., 2004) et similaires aux dynamiques observées des SLMVs des autres types cellulaires. Traditionnellement, les études qui ont porté sur l'élévation calcique suite à la stimulation de GPCRs (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Parri et al., 2001; Pasti et al., 2001; Fiacco and McCarthy, 2006) ont caractérisé une augmentation calcique somatique et globale. Les dynamiques de cette augmentation calcique sont trop lentes (1.5s pour la stimulation des mGluRs) pour induire la fusion rapide des SLMVs. Il est possible d'imaginer l'existence d'augmentations calciques plus localisées, plus rapides et de plus courte durée pouvant induire la fusion des SLMVs et qui n'auraient pas été détectées lors des études précédemment citées. Ce type d'augmentation calcique localisée a été décrite dans les fins processus des cellules de Bergmann (Grosche et al., 1999; Grosche et al., 2002). Par ailleurs, l'utilisation de nouvelles techniques d'imagerie comme l'imagerie biphotonique a permis d'observer des augmentations calciques très rapides (500ms environ, Winship et al., 2007) dans les astrocytes *in vivo* suite à stimulation sensorielle des neurones adjacents. Pour que ces élévations calciques localisées puissent induire la fusion rapide des SLMVs, il faut également imaginer l'existence d'un rapprochement structural (probablement inférieur au micromètre) entre le RE et les SLMVs à proximité des sites de fusion. Il est également possible que les GPCRs soient associés à ces microdomaines comme c'est le cas pour les synapses glutamatergiques (Tu et al., 1998; Xiao et al., 1998; Sala et al., 2005).

1.5. Méthodes d'observation de la sécrétion régulée

Il existe de nombreuses méthodes d'étude de la sécrétion et on distingue méthodes biochimiques, électriques et optiques. Les méthodes biochimiques permettent de caractériser rapidement et efficacement la sécrétion d'une population de cellules en observant sa réponse à différents stimuli. Mais la réponse sécrétrice, mesurée par des dosages, n'est faite ni en temps réel ni avec une résolution temporelle très précise (au mieux de l'ordre de quelques secondes).

Les méthodes électriques (électrophysiologiques et électrochimiques) ont largement été utilisées à cause de leur grande résolution temporelle (de l'ordre de la milliseconde). Elles permettent de suivre, en temps réel, la sécrétion régulée à l'échelle de la cellule mais également à l'échelle des événements unique d'exocytose (Albillos et al., 1997). Elles ont permis une caractérisation très précise de la sécrétion régulée dans différents types cellulaires. Elles ont permis d'explorer très finement les dynamiques de ces sécrétions régulées (Neher and Zucker, 1993; Parsons et al., 1995; Eliasson et al., 1997; Voets et al., 1999) mais également leur dépendance au calcium (Heidelberger et al., 1994; Heinemann et al., 1994) ainsi que les différents modalités de fusion. Elles ont également permis de déduire l'existence de différentes populations de vésicules plus ou moins compétentes pour la fusion ("readily releasable pool" et "slowly releasable pool", Voets et al., 1999). Pour autant, ces méthodes ne permettent d'avoir un accès direct qu'aux étapes d'exocytose et permettent difficilement d'explorer les étapes précédant la fusion ainsi que les étapes de recyclage et ne donnent aucune information spatiale sur la localisation ou la mobilisation des organelles.

Les méthodes optiques n'ont permis, que très récemment, de compléter avantageusement les données obtenues par les méthodes électriques. Bien que possédant une assez bonne résolution temporelle (de l'ordre de la dizaine de milliseconde), pour qu'elles puissent faire concurrence aux méthodes électriques, il a fallu attendre les énormes progrès techniques apportés à la microscopie pour augmenter sa résolution spatiale. Par ailleurs, le développement considérable des rapporteurs fluorescents utilisés pour les méthodes optiques a également joué un rôle dans l'utilisation de ces méthodes.

Les premiers articles utilisant la microscopie de fluorescence (à champ large ou épifluorescence) s'appuient sur des mesures de fluorescence globale au niveau de la membrane cellulaire (Betz and Bewick, 1992; Ryan et al., 1993). Après stimulation des cellules, on détecte l'exocytose par une augmentation de la fluorescence au niveau de la surface cellulaire. Cependant, la détection d'un événement unique d'exocytose ne peut être réalisée que dans des cas rares (en réussissant à ne marquer que quelques SVs, Ryan et al., 1997). L'utilisation de l'épifluorescence présente donc un intérêt assez limité, par rapport aux méthodes électriques, si elle ne peut pas être couplée à une analyse plus fine à l'échelle des événements uniques.

L'apparition de la microscopie confocale, de la microscopie TIRF (total internal reflexion fluorescence) et de la microscopie multiphotonique a permis d'augmenter considérablement la résolution spatiale de la microscopie à fluorescence. La microscopie confocale a eu peu de succès pour l'étude de la sécrétion régulée à cause de sa faible résolution temporelle. Bien que de récents développements de la microscopie confocale, comme les spinning disk, ont permis d'augmenter cette résolution temporelle, la microscopie confocale a été prise de vitesse, dans l'étude de la sécrétion, par

la microscopie TIRF pour les études sur les cultures (Bezzi et al., 2004, pour un exemple de son application pour les astrocytes) et par la microscopie multiphotonique pour les études *in vivo* (Winship et al., 2007, pour un exemple de son application pour les astrocytes).

1.5.1. Principe de la microscopie TIRF

La microscopie TIRF permet, en utilisant un phénomène optique, de limiter l'excitation (et donc l'émission) des fluophores à une mince couche de la cellule proche de la membrane plasmique (environ une centaine de nanomètres). Elle est donc particulièrement adaptée pour suivre les phénomènes rapides se produisant à proximité de la membrane plasmique comme la sécrétion régulée.

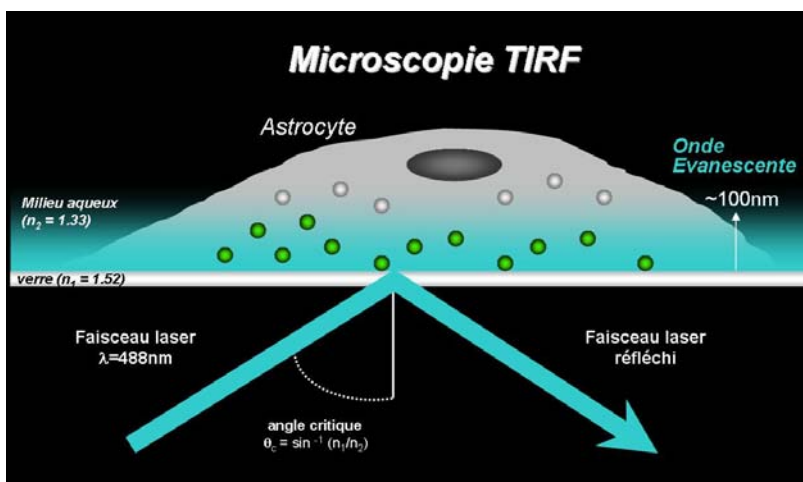


Figure 13. Schéma du fonctionnement de la microscopie TIRF.

Le faisceau laser est totalement réfléchi avant de pénétrer dans l'échantillon, provoquant une onde évanescente. Cette onde évanescente excite les fluophores présents dans l'échantillon, cependant comme son intensité décroît de manière exponentielle, seuls les fluophores proches de l'interface (environ 100nm) sont excités. La microscopie TIRF permet de visualiser avec une très bonne résolution spatiale et temporelle les événements proches de la membrane plasmique.

Le principe de la microscopie TIRF, basé sur les lois de Snell-Descartes, est relativement simple (**Figure 13**) : si un faisceau lumineux traversant un milieu 1 d'indice élevé n_1 (par exemple du verre) rencontre un milieu 2 d'indice plus faible n_2 (par exemple un milieu aqueux ou une cellule adhérente) et que l'angle d'incidence α est faible, le faisceau est partiellement réfracté et se propage dans le milieu 2. Lorsque l'angle d'incidence α dépasse un certain angle, le faisceau subit une réflexion totale et il n'y a plus de rayon réfracté. Cependant, même s'il est totalement réfléchi, le faisceau incident crée un champ électromagnétique dit évanescent qui pénètre dans le milieu 2 et dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance à partir de l'interface (Steyer and Almers, 2001). La profondeur de pénétration de l'onde d'évanescence dépend de l'angle d'incidence, de la longueur d'onde et de la polarisation de la lumière ainsi que des indices de réfraction des milieux 1 et 2. Dans le type de configuration qui nous intéresse avec un faisceau laser ($\lambda \sim 500$ nm) venant se réfléchir au niveau d'une interface verre/milieu cellulaire, on génère une onde évanescente dont la pénétration est d'environ 100nm. Il en résulte un rapport signal/bruit amélioré par rapport à l'épifluorescence et suffisant pour suivre les vésicules de manière individuelle. Par ailleurs, cette limitation ne nécessitant pas de balayage, comme c'est le cas pour la microscopie confocale, sa bonne résolution spatiale s'associe à une bonne résolution temporelle (10 à 40Hz de manière générale). D'autre part, la microscopie TIRF illumine une coupe d'épaisseur beaucoup plus mince

(environ 100 nm) que celle obtenue avec les microscopies confocale et biphotonique (~500-800 nm). Cette fine coupe optique permet donc un bien meilleur rapport signal/bruit et une meilleure résolution spatiale suivant l'axe orthogonal au plan focal. Par ailleurs, les dommages cellulaires et le photoblanchiment des fluorophores dus à l'illumination sont considérablement diminués. Malheureusement, ce qui fait sa précision fait également son handicap, ne pouvoir aller au-delà des 100nm au dessus de la lamelle en verre limite la microscopie TIRF à des études portant sur des cellules en culture. Mais dans son domaine d'action, l'association d'une grande résolution spatiale et d'une excellente résolution temporelle, avec un faible dommage des échantillons observés, fait de la microscopie TIRF la méthode d'imagerie la plus performante pour l'observation de processus biologiques rapides ayant lieu au niveau de la membrane plasmique ou à proximité de celle-ci.

1.5.2. Outils fluorescents utilisés pour l'étude de la sécrétion régulée

Quel que soit le type de microscopie à fluorescence utilisé, sa performance ne signifie rien si elle n'est pas accompagnée de l'utilisation des outils fluorescents adéquats pour suivre le processus de sécrétion régulée.

Ces 15 dernières années ont vu l'explosion des outils fluorescents. Petites molécules fluorescentes ou dérivés de la GFP (green fluorescent protein), ces outils fluorescents permettent de suivre une large gamme de processus biologiques : modulation de l'expression des protéines, interactions entre protéines, modification de la concentration ionique (modification du pH, du sodium, du calcium, etc.), translocation des protéines, suivi des compartiments intracellulaires, etc. L'étude de la sécrétion régulée a, bien entendu, profité du développement de ces nouveaux outils en pouvant suivre de manière spécifique les différents compartiments impliqués dans la sécrétion et le recyclage et en pouvant visualiser les événements d'exocytose et d'endocytose.

1.5.2.1. Les rapporteurs fluorescents des compartiments intracellulaires

Il existe certaines petites molécules fluorescentes pouvant s'accumuler plus particulièrement dans les différents compartiments intracellulaires comme le Mitotracker, le Lysotracker ou le ERTracker. Néanmoins, il est difficile d'utiliser ce type de marqueurs pour charger spécifiquement les SLMVs ou les DCGs. C'est pour cela que l'utilisation des protéines chimériques fluorescentes leur a été préférée. En fusionnant une protéine exprimée spécifiquement dans un type de compartiment avec la GFP ou l'un de ses dérivés et en faisant exprimer cette protéine fusion dans les cellules, il est possible d'obtenir un marquage spécifique de l'un des compartiments intracellulaires. Ainsi une large gamme de protéines chimériques a été développée à partir des protéines SNARE vésiculaires (synaptophysin), des transporteurs vésiculaires (VGluT1, VGluT2), des marqueurs spécifiques (phogrin, sécrétogranines) ou même des contenus peptidiques des DCGs (NPY, insuline) et des différentes formes de la GFP (GFP et eGFP en vert ou DsRed et mCherry en rouge sont les plus utilisées). Si la fluorescence de ces protéines chimériques peut varier lors de la fusion en se diffusant

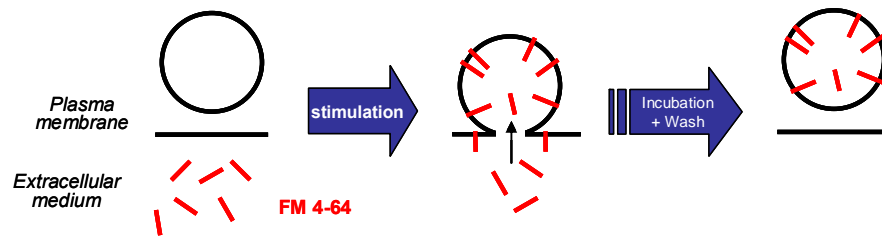
dans la membrane plasmique (pour les protéines membranaires) ou en étant libérée dans le milieu extracellulaire (pour les protéines contenues dans les DCGs) et donner quelques indications sur la sécrétion, ces signaux sont relativement faibles et peu commodes à analyser, c'est pour cela que les protéines chimériques sont surtout utilisées comme marqueurs spécifiques des organelles. Elles permettront de suivre la position et la morphologie d'une population spécifique d'organelles mais donneront assez peu d'information sur le processus de sécrétion lui-même. Elles sont donc, en général, associées à des rapporteurs de l'exocytose et/ou de l'endocytose.

1.5.2.2. Les rapporteurs fluorescents des processus d'exo-endocytose

L'acridine orange (AO) est une substance fluorescente qui a été assez souvent utilisée pour suivre l'exocytose (Steyer et al., 1997; Avery et al., 2000; Tsuboi et al., 2000; Bezzi et al., 2004; Crippa et al., 2006). Elle traverse les membranes cellulaires et s'accumule massivement dans les compartiments acides. Lorsque les compartiments chargés avec l'AO fusionnent avec la membrane plasmique, celle-ci est libérée dans le milieu extracellulaire. Cette libération s'accompagne d'un « flash » de fluorescence due au passage de l'AO d'un état fortement concentré à un état moins concentré. Ce flash est suivi d'une diffusion de la fluorescence correspondant à la diffusion de l'AO dans le milieu extracellulaire. La grande variation de fluorescence de l'AO lors de la fusion des vésicules permet une analyse simple des dynamiques de la sécrétion à l'échelle de la cellule. Mais elle donne assez peu d'indication sur la durée de l'événement de fusion, sur son type et ne permet pas de suivre ni l'endocytose ni le recyclage des organelles. D'autre part, son instabilité à la lumière et le fort bruit de fond du marquage cytosolique la rend délicate à utiliser pour des études portant sur la caractérisation des événements à l'échelle des vésicules.

Une autre catégorie de substances fluorescentes a largement été utilisée pour l'étude de la sécrétion régulée : les colorants styryles (notamment les FM1-43 et FM4-64 ; Betz and Bewick, 1992). Ces colorants sont des composés qui s'intègrent à la membrane plasmique sans pouvoir la traverser. Appliqués lors d'une stimulation, ces colorants peuvent donc être internalisés par endocytose (Zenisek et al., 2000). Ils permettent donc de suivre l'endocytose et le recyclage des organelles qui ont fusionné lors de la stimulation. Internalisés lors d'une première stimulation, ils permettent également de suivre l'exocytose lors d'une seconde stimulation (**Figure 14**). Par conséquent, ils sont plus susceptibles de charger les compartiments qui peuvent réaliser plusieurs cycles de fusion comme les SVs ou les SLMVs. Cependant, selon le protocole du chargement, le marquage pourra être orienté vers différentes populations d'organelles (Brumback et al., 2004; Gaffield and Betz, 2006). Ils permettent de pouvoir suivre les différentes étapes d'exocytose, d'endocytose et de recyclage, d'en déterminer les dynamiques et les modalités que ce soit à l'échelle de la cellule ou des vésicules.

1. Chargement de la FM ou observation de l'endocytose et du recyclage



2. Observation de l'exocytose

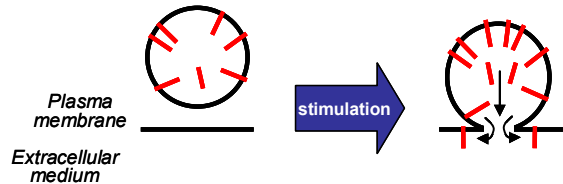


Figure 14.

Utilisation de la FM4-64 pour suivre la sécrétion régulée.

1. La FM4-64 est présente dans le milieu extracellulaire, une stimulation provoque la fusion des vésicules et permet à la FM4-64 de s'accumuler dans ces vésicules. Cela permet de suivre l'endocytose et le recyclage des vésicules. Cette étape peut également être l'étape de chargement pour suivre ensuite l'exocytose des vésicules. 2. Lorsque la cellule a été chargée avec la FM4-64, celle-ci est uniquement présente dans les vésicules ayant déjà fusionné, une seconde stimulation permet de suivre la fusion de ces vésicules.

1.5.2.3. La pHluorin

Les pHluorins sont des dérivés de la GFP assez récemment développés pour l'étude de la sécrétion régulée. La fluorescence de la GFP est naturellement sensible au pH, des mutations ponctuelles ont été introduites dans la séquence de la GFP afin d'augmenter sa sensibilité au pH.

Dans ces mutants, que l'on a nommé pHluorins, la fluorescence est complètement abolie à des pH inférieurs à 6. De la même façon que la GFP et les autres dérivés de la GFP, la pHluorin peut être fusionnée à d'autres protéines. Fusionnée à une protéine vésiculaire de façon à ce que la pHluorin soit exprimée sur la face interne des vésicules, la pHluorin permet de suivre les étapes d'exocytose, d'endocytose et de recyclage de cette vésicule (Sankaranarayanan and Ryan, 2000; Atluri and Ryan, 2006; Schweizer and Ryan, 2006; Voglmaier et al., 2006). Les vésicules ont, en effet, un pH acide (pH 5-5.5), la pHluorin n'est donc pas fluorescente à l'intérieur des vésicules. Par contre, lorsque ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, la pHluorin est exposée au milieu extracellulaire (pH 7.4) et devient fluorescente permettant ainsi de détecter les événements de fusion. Par la suite, lors du recyclage, la vésicule sera de nouveau réacidifiée et la pHluorin perdra sa fluorescence, permettant donc de suivre l'endocytose et le recyclage des vésicules (**Figure 15**).

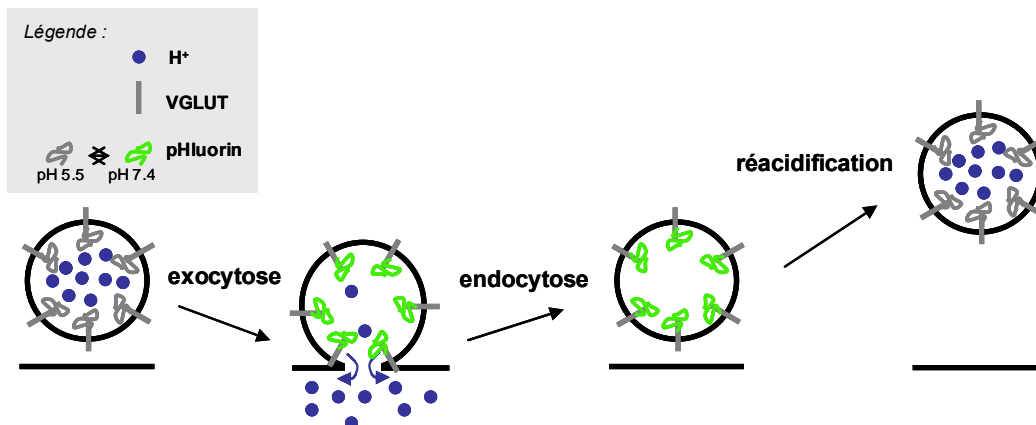


Figure 15. Utilisation de la pHluorin pour suivre la sécrétion régulée. Fusionnée au VGLUT, la pHluorin est exprimée sur la face interne de la vésicule. Le pH acide des vésicules (pH 5-5.5) supprime la fluorescence de la pHluorin. Lors de la fusion avec la membrane plasmique, la pHluorin est exposée au milieu extracellulaire (pH 7.4) et devient fluorescente permettant ainsi de détecter les événements de fusion. Par la suite, lors du recyclage, la vésicule sera de nouveau réacidifiée et la pHluorin perdra sa fluorescence, permettant donc de suivre l'endocytose et le recyclage des vésicules.

L'utilisation de la pHluorin présente différents avantages par rapport aux autres rapporteurs de l'exocytose et de l'endocytose : 1. fusionnée à un marqueur spécifique, elle permet d'étudier la sécrétion régulée d'une seule population d'organelles en s'affranchissant de la contribution des autres types d'organelles (par exemple, fusionnée au VGLUT, elle permettra de suivre spécifiquement la sécrétion des SLMVs glutamatergiques), 2. elle permet de visualiser le début de la fusion comme l'AO ou les colorants FM, mais comme elle reste intégrée à la membrane des vésicules et permettra de suivre l'intégralité de l'événement d'exocytose contrairement à l'AO qui est immédiatement libérée dans le milieu extracellulaire ou aux colorants FM qui sont plus rapidement diffusés dans la membrane plasmique ou le milieu extracellulaire, 3. contrairement aux colorants FM qui nécessitent deux étapes pour visualiser l'exocytose et l'endocytose, la pHluorin permet de suivre intégralement la fusion, l'internalisation et le recyclage d'une même vésicule.

2. RESULTATS

2.1. Préambule

La section « résultats » de ce manuscrit de thèse est composée de deux articles :

1. *SDF 1- α (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: Imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. J. of Neuroimmun., 2008.*
2. *Fast subplasma membrane Ca²⁺ transients control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes. J. of Neurosci., 2008.*

Ces deux articles portent sur la caractérisation de la libération de glutamate par exocytose régulée des SLMVs glutamatergiques des astrocytes. Pour les deux articles, je partage la responsabilité scientifique avec Corrado Cali, j'ai donc participé à la mise en place et à la réalisation des expériences, à leur analyse ainsi qu'à la rédaction des manuscrits. Le but de ces articles était de développer de nouvelles stratégies expérimentales pour étudier de manière fine les propriétés dynamiques de la sécrétion régulée glutamatergique des astrocytes et d'en identifier différents acteurs afin de mieux cerner l'implication fonctionnelle que peut représenter ce processus dans le fonctionnement cérébral. Le second article fut réalisé en collaboration avec le Professeur R. Edward (UCSF, USA). Ces deux articles sont complémentaires mais peuvent se lire de manière tout à fait indépendante.

J'ai également ajouté à ces deux articles des résultats complémentaires qui portent sur la caractérisation des SLMVs glutamatergiques, obtenus lors de la mise en place de ces projets. Ces résultats n'ont pas donné lieu à une publication bien qu'une partie ait été intégrée dans les documents supplémentaires de Marchaland et al., 2008. J'ai décidé de les intégrer ici car ces résultats sont très importants pour une entière compréhension de la sécrétion régulée de ces SLMVs glutamatergiques des astrocytes.

2.2. SDF1- α (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: Imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J. of Neuroimmunol.*

2.2.1. Finalité de l'article

Dans ce premier article, nous avons adapté une stratégie récemment développée pour l'étude du recyclage des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons neuronales pour suivre l'exocytose induite par l'activation du CXCR4 dans les astrocytes. Cette stratégie expérimentale consiste à combiner l'utilisation des colorants styryles (FM4-64) avec une technique d'imagerie particulièrement performante pour suivre de manière dynamique la sécrétion régulée, la microscopie TIRF. Nous avons du modifier et adapter la méthode pour suivre, à l'échelle de la vésicule, la sécrétion régulée du glutamate induite par l'activation des CXCR4. Cette étude propose une description détaillée des propriétés dynamiques de la sécrétion de glutamate des astrocytes induite par les chemokines et supporte l'implication des chemokines dans une communication rapide entre les différentes cellules cérébrales.

2.2.2. Participation personnelle

Dans ce premier article, je suis co-auteur avec Corrado Cali.

J'ai réalisé la plupart des expériences en binôme avec lui et nous avons confronté nos compétences respectives et complémentaires pour mener à bien ce projet. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit.

Cette étude a été publiée dans la revue *Journal of Neuroimmunology* et a été accompagnée de la rédaction d'un chapitre d'un livre *Chemokine receptors and neuroaids: beyond co-receptor function and links to other neuropathologies* (voir annexes).

SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: Imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy

Corrado Calì¹, Julie Marchaland¹, Romano Regazzi, Paola Bezzi*

Department of Cell Biology and Morphology, FBM, University of Lausanne, rue du Bugnon 9, 1005 Lausanne, Switzerland

Received 9 April 2008; accepted 10 April 2008

Abstract

Chemokines are small chemotactic molecules widely expressed throughout the central nervous system. A number of papers, during the past few years, have suggested that they have physiological functions in addition to their roles in neuroinflammatory diseases. In this context, the best evidence concerns the CXC-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1 α or CXCL12) and its receptor CXCR4, whose signalling cascade is also implicated in the glutamate release process from astrocytes. Recently, astrocytic synaptic like microvesicles (SLMVs) that express vesicular glutamate transporters (VGLUTs) and are able to release glutamate by Ca²⁺-dependent regulated exocytosis, have been described both in tissue and in cultured astrocytes. Here, in order to elucidate whether SDF-1 α /CXCR4 system can participate to the brain fast communication systems, we investigated whether the activation of CXCR4 receptor triggers glutamate exocytosis in astrocytes. By using total internal reflection (TIRF) microscopy and the membrane-fluorescent styryl dye FM4-64, we adapted an imaging methodology recently developed to measure exocytosis and recycling in synaptic terminals, and monitored the CXCR4-mediated exocytosis of SLMVs in astrocytes. We analyzed the co-localization of VGLUT with the FM dye at single-vesicle level, and observed the kinetics of the FM dye release during single fusion events. We found that the activation of CXCR4 receptors triggered a burst of exocytosis on a millisecond time scale that involved the release of Ca²⁺ from internal stores. These results support the idea that astrocytes can respond to external stimuli and communicate with the neighboring cells via fast release of glutamate.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Astrocytes; Exocytosis; Glutamate; Chemokines; TIRF; Imaging

1. Introduction

Chemokines are a class of small molecules acting via G protein-coupled receptors (GPCRs). They were first identified as inflammatory mediators of leukocyte chemotaxis and have been subsequently shown to possess a much larger repertoire of physiological and pathological functions (Rossi and Zlotnik, 2000). Chemokines are found not only in the immune system but, together with their receptors, are also

widely expressed in the brain, both in glial cells and neurons (Asensio and Campbell, 1999). In particular, the distribution pattern of both CXC-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1 α or CXCL12) and its receptor CXCR4 in the brain suggests that the SDF-1 α /CXCR4 system is involved in cellular communication between glia and neurons (Banisadr et al., 2002). Recently, a number of papers have suggested that the CXCR4-mediated pathway can participate to the physiological communication systems in the brain (Zheng et al., 1999a,b; Limatola et al., 2000; Bezzi et al., 2001; Ragozzino et al., 2006; Skrzydelski et al., 2007; for review see Rostene et al., 2007). For instance, the application of SDF-1 α in the nigrostriatal dopamine network not only modifies the firing pattern of dopaminergic neurons, but also affects extracellular dopamine

* Corresponding author. Tel.: +41 21 692 5284.

E-mail address: Paola.Bezzi@unil.ch (P. Bezzi).

¹ These authors contribute equally to this work.

release from the striatum *in vivo* (Skrzydelski et al., 2007). A breakthrough in the study of SDF-1 α /CXCR4 system occurred when evidence of its involvement in HIV-1 entry into cells (for review see Berger et al., 1999) and in the pathogenesis of AIDS dementia (for review see Corasaniti et al., 1998, 2001, 2003; Kaul et al., 2001) was provided.

Moreover, the activation of CXCR4 receptors is involved in the Ca²⁺-dependent signalling cascade leading to glutamate release from astrocytes (Bezzi et al., 2001). The glutamate release process was described as a complex signalling pathway involving the extracellular release of molecules such as glutamate, TNF α and prostaglandins, (Bezzi et al., Domercq et al., 2006) which was dramatically amplified in the presence of activated microglial cells (Bezzi et al., 2001).

The mechanism of glutamate release from astrocytes has been extensively investigated during the past ten years (for review see Volterra and Meldolesi, 2005). The Ca²⁺-dependent release process is generally triggered by GPCRs such as bradykinin receptors, metabotropic glutamate receptors (mGluR) or purinergic P2Y1 receptors (Parpura et al., 1994; Bezzi et al., 1998; Sanzgiri et al., 1999; Bezzi et al., 2001; Bezzi et al., 2004; Domercq et al., 2006). Recently, synaptic like microvesicles (SLMVs) equipped for uptake, storage and release of glutamate have been identified at ultrastructural level, both *in vitro* and in tissue (Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007) and Ca²⁺-dependent glutamate exocytosis has been documented by total internal reflection fluorescence (TIRF) imaging (Bezzi et al., 2004; Domercq et al., 2006), membrane capacitance (Zhang et al., 2004; Kreft et al., 2004) and electrochemical amperometry (Chen et al., 2005). In spite of these findings, it has never been investigated whether the activation of the astrocytic CXCR4 receptor triggers the release of glutamate by exocytosis. This is an important issue that can clarify the physiological role of chemokines in the brain, particularly after recent suggestions that glutamate exocytosis from astrocytes can modulate synaptic transmission (Fellin et al., 2004; Fiacco and McCarthy, 2006; Jourdain et al., 2007; Perea and Araque, 2007). Investigating whether SDF-1 α /CXCR4 system is able to trigger glutamate exocytosis in astrocytes may therefore elucidate whether chemokines can participate to fast brain signalling.

Here we studied CXCR4-mediated exocytosis in astrocytes by taking advantage of a state-of-the-art imaging methodology recently developed to investigate synaptic vesicles (SVs) turnover in the nerve terminals (Zenisek et al., 2002; Aravanis et al., 2003; Richards et al., 2005; Harata et al., 2006). This method is based on the properties of styryl dyes FM (Betz and Bewick, 1992) and on the new-generation optical technology for studying endo-exocytosis processes, the total internal reflection (TIRF) microscopy (Steyer and Almers, 2001). We adapted the imaging approach in order to study the properties of CXCR4-mediated glutamate exocytosis in astrocytes at the single-vesicle level. By providing a detailed description of the dynamics of chemokine-mediated exocytic processes in astrocytes, the present study supports the recently proposed role for chemokines in the fast communication system in the brain.

2. Materials and methods

2.1. Pharmacological agents, constructs and transfection

All agents were from Sigma (St Louis, USA), unless otherwise indicated. Plasmid containing the VGLUT2-EGFP was prepared as previously described (Bezzi et al., 2004). 0.5 μ g of VGLUT2-EGFP was transfected into primary rat cortical astrocytes cultures with FuGene6 (3 μ l, Roche Diagnostics).

2.2. Astrocyte cultures for imaging experiments

Astrocyte cultures containing >99% GFAP-positive cells (\leq 8% of which positive for the neural precursor marker LeX) were obtained from newborn rats. They were prepared as described (Bezzi et al., 2001), plated (0.1–0.2 \times 10⁴ cells) on glass coverslip and transfected 3-days later with VGLUT2-EGFP construct. The experiments were performed 2–5 days after transfection; coverslips were mounted in the open perfusion incubator (Harvard Apparatus) on the stage of a Zeiss Axiovert 200 fluorescence inverted microscope modified for double wavelength (488/568 nm) TIRF experiments (Visitron System, Germany) or on the stage of a confocal microscope Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Germany) equipped with Argon 458/476/488/514, HeNe 543 nm. Images for co-localization (both for TIRF and confocal illuminations) were acquired from living cells at room temperature. In experiments where we labeled VGLUT2-EGFP expressing cells with FM4-64, the coverslips with cells were superfused with HEPES-KRH (containing in mM NaCl 120, KCl 3.1, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 1.25, glucose 4, HEPES-Na 25, buffered to pH 7.4) containing 15 μ M FM4-64 (Molecular Probes) and 0.01–10 mM DHPG for 30 s. This solution was expected to stimulate exocytosis in astrocytes (Bezzi et al., 2004). In the staining protocol designed to allow full staining of individual vesicles, the FM dye was kept in the extracellular solution for about 1 h following stimulation (Fig. 2A). Next, the extracellular FM dye was washed by superfusion for about 15–20 min with HEPES-KRH containing 0.1–0.2 mM of ADVASEP-7 (Molecular Probes) which reduces background staining of plasma membrane with FM4-64. After the wash, the superfusion was switched to normal HEPES-KRH solution. In experiments where we monitored dynamics of fusion events with TIRF, the experimental chamber (250 μ l volume) was perfused at a rate of 1–1.5 ml/min. The stimulus (SDF-1 α , 3 nm, R&D System Europe, UK) was applied rapidly (2 s) via a software-controlled micro-perfusion fast-step device (100 μ l/min, Warner Instruments Corp.). AMD3100 (Sigma Aldrich, Germany) was used at a final concentration of 100 ng/ml (diluted with HEPES-KRH) and incubated for 3–5 min before the stimulus. In experiments with BAPTA-AM (50 μ M), the drugs were diluted in HEPES-KRH and incubated for 15–20 min. In experiments with thapsigargin or cyclopiazonic acid (Thapsi and CPA, CalBiochem, USA), the drugs were diluted in HEPES-KRH, incubated for 15–20 min, and the stimulus was subsequently

applied after about 15 min of recovery (to allow the Ca^{2+} recovered to basal level, Domercq et al., 2006).

2.3. Optical imaging and data acquisition

Confocal or TIRF illuminations were alternatively used for our experiments. Confocal illumination was used for co-localization analysis of intracytoplasmic SLMVs expressing VGLUT2-EGFP and loaded with FM4-64. The Harvard Apparatus incubator was mounted on a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss, Germany) located at the Center of Imaging Facility (CIF, FBM, UNIL). An optical slice of about 1 μm was acquired focusing the 488 nm Argon laser (for EGFP) and HeNe 543 nm laser (for FM4-64) deep in the cytosol. Images were collected using a 100X oil objective (Plan neofluar 100X, 1.30 NA) with 2X2 binning. Post-acquisition analysis and processing of confocal images was performed using MetaMorph.

TIRF illumination was used for all the remaining experiments. The expanded beam of a 488/568 nm argon/krypton multiline laser (20 mW, Laserphysics, USA) passed through an AOTF laser wavelength selector (VisiTech International, USA) synchronized with a SNAP-HQ CCD camera (Roper Scientific, Germany) under Metafluor software (Universal Imaging, USA) control, and was conveyed to the coverslip from the high numerical aperture objective lens (Zeiss α -plan FLUAR 100X, 1.45 NA). Light entered the coverslip and underwent total internal reflection at the glass-cell interface. In our experimental conditions penetration depth of TIRF illumination was calculated to be ~ 90 nm (Cheviet et al.,

2006; Domercq et al., 2006). In dual-wavelength TIRF illumination (488/568 nm), laser beams were combined by a dichroic mirror from a Zeiss filter 24 at 20 Hz. The pixel size was 126 nm (at binning 2×2).

2.4. Image analysis

Video images, digitized with Zeiss confocal software or with MetaFluor, were analyzed with MetaMorph software (Universal Imaging, USA).

For co-localization analysis confocal and TIRF images acquired on green (488 nm ex) and red channels (568 nm ex) were overlaid with MetaMorph software. In order to select VGLUT2-EGFP spots corresponding to single vesicles both in confocal or TIRF images, we used the information obtained from TIRF microscopy experiments (Fig. 1). According to those experiments, a single SLMV expressing VGLUT2-EGFP corresponds to a fluorescent spot with an average diameter (number of pixels) of 3 ± 0.4 pixels ($n=20$). We applied this information to the preparations where we wanted to verify the co-localization of VGLUT and FM. We took images of VGLUT2-EGFP and FM4-64 spots under both TIRF and confocal-fluorescence illumination in order to compare single-vesicle diameters under the two illumination systems. Once verified that an EGFP/FM spot with a diameter of about 3 pixels both under TIRF and in confocal illumination corresponded to a single vesicle, we performed the double-labeling analysis confined to spots with diameter of 3 pixels and considered as co-localized only spots overlapping by $\geq 2/3$ (6/9 pixels, Fig. 2D).

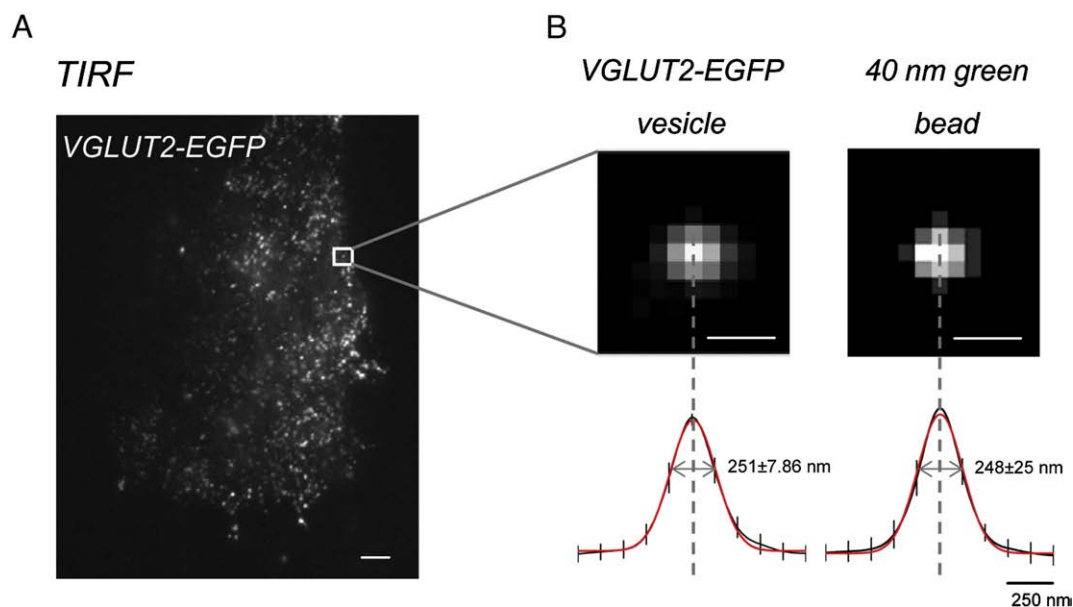


Fig. 1. Imaging single VGLUT-positive synaptic like microvesicle (SLMV) in astrocytes. Experiments were performed under TIRF illumination. A. TIRF image of an astrocyte transfected with VGLUT2-EGFP. Fluorescent spots represent the expression of VGLUT2-EGFP on SLMVs located inside the EW illumination field (~ 90 nm). Bar: 5 μm . B. TIRF images of a representative “new comer” SLMV (cytosolic vesicle entering the TIRF field and approaching the plasma membrane) expressing VGLUT2-EGFP, and of a 40 nm green fluorescent bead. Bar: 500 nm. C. Average radial sweeps of SLMVs expressing VGLUT2-EGFP ($n=20$) and of 40 nm fluorescent beads ($n=20$) calculated by plotting the fluorescence intensity against the distance from the centre of the fluorescent spot. Red lines represent the best Gaussian fits (σ values are written on the side in grey). Bar: 500 nm.

The dynamics of a single fusion event of VGLUT-positive SLMV was studied in TIRF experiments by monitoring retrospectively the FM fluorescence destaining by positioning a circle (diameter: 756 nm) on the VGLUT2-EGFP spot and in a concentric annulus (inner diameter: 0.756 μm ; outer diameter: 2 μm) (Bezzi et al., 2004; Zenisek et al., 2000). Fluorescence changes were expressed as background-subtracted fluorescence (F). Only when fluorescence increased, spread and then declined over the basal level, the event was counted as a fusion event (Zenisek et al., 2002). In some experiments the fate of VGLUT2-EGFP was analyzed by positioning a circle as above on each spot and by comparing the EGFP fluorescence intensity just before the fusion event and 350 ms after the FM disappearance.

3. Results

3.1. Characterization of FM4-64 loading in single VGLUT-positive SLMV

In order to test whether the activation of CXCR4 receptor induces glutamate exocytosis in astrocytes, we devised a strategy to specifically load synaptic like microvesicles (SLMVs) expressing vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) with a marker of fusion events. First, to visualize the VGLUT-positive SLMVs, we transfected primary astrocytes cultures with VGLUT2-EGFP a chimerical fluorescent VGLUT construct (Bezzi et al., 2004; Domercq et al., 2006). Fluorescent SLMVs were excited with the evanescent wave (EW) illumination obtained with TIRF microscopy (Steyer and Almers, 2001) which selectively illuminates a thin layer of cytosol adjacent to the plasma membrane (see cartoon in Fig. 2B). Fig. 1A shows that, under TIRF illumination, SLMVs expressing VGLUT2-EGFP and located close to the plasma membrane appear as small fluorescent spots. In previous studies we had visualized exocytic events with acridine orange (AO), a red dye cargo able to signal fusion events through “flashes” of light due to the dye dequenching when it is released in the external medium during exocytosis (Steyer et al., 1997; Avery et al., 2000; Bezzi et al., 2004; Domercq et al., 2006). AO is not, however, well suited to experiments where one need to monitor the behavior of a vesicle before the fusion process because: (1) it is photo-unstable when excited for a long period of time and with a powerful light source (*i.e.* direct exposition to a confocal laserbeam); (2) it labels the cell cytoplasm and nucleus, interfering with the visualization of non-docked vesicles (*i.e.* the cytoplasmic vesicles pool). We therefore planned to conduct our studies with a different red dye, the fluorescent lipid FM4-64 (Betz and Bewick, 1992). Like other FM dye variants, FM4-64 is an amphipathic molecule that stains lipid membrane but cannot passively cross them because of its permanently positive charge. Previous work performed in neurons and neurosecretory cells showed that application of FM4-64 during periods of activity results in the labelling of recycling vesicles, which internalize the dye during exo-endocytosis processes (Zenisek et al., 2000). Exocytosis of individual labelled vesicles can be subsequently visualized by following FM4-64 de-staining (Zenisek et al., 2000, 2002). In the

case of astrocytic SLMVs, we have now set up a protocol resulting in the effective labeling of the recycling pool.

At first we created appropriate conditions to observe fluorescent spots representing single SLMV. The best way to distinguish a single-vesicle from a group of vesicles is to choose fluorescent spots appearing randomly in the TIRF field during an imaging period. Such spots represent cytosolic vesicles entering the TIRF field and approaching the plasma membrane (the so called “newcomer” vesicles; Zenisek et al., 2000). Analysis of “newcomer” SLMVs was performed in green fluorescent VGLUT2-EGFP vesicles by plotting fluorescence intensity of EGFP against the distance from the centre of the fluorescent spot (Fig. 1B, black curve \pm SD). From the values obtained in this analysis we provided an estimation of the so called “radial sweep”. The “radial sweep” of a fluorescent spot represents the average distribution of its fluorescence intensity calculated by placing 6 concentric circles around the center with diameters spaced in increments of 1 pixel unit (126 nm). For each circle, fluorescence at 8 points (see Supplementary info Fig. 1) around the circle was measured and averaged. The average fluorescence distribution was then plotted against the distance from the center of the vesicle.

Similarly to SV, the “radial sweep” of a VGLUT2-EGFP SLMV was well fitted by a one-dimensional Gaussian function (Zenisek et al., 2002). Curves in Fig. 1B represents the average “radial sweep” calculated from 20 VGLUT2-EGFP SLMVs. From its Gaussian function we calculated its sigma σ : 251 ± 7.86 nm. We compared the σ value with the corresponding value of “radial sweep” curves calculated from green fluorescent beads of different diameter and found correspondence with the σ value of 40 nm beads (248 ± 25 nm, $n=10$). Thus, this analysis provides an estimated diameter for glutamatergic SLMVs analogous to that measured in electron micrographs of both tissue and cultured astrocytes (~ 40 nm; Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007), and supports the conclusion that fluorescent spots with diameter of about 3 pixels (378 nm) correspond to individual SLMVs.

In the next set of experiments, we stained SLMVs with the FM4-64 (Fig. 2A) by exposing astrocytes transfected with VGLUT2-EGFP to the FM dye while the cells were stimulated to undergo exo-endocytosis. As a stimulus we used an agonist of the group I mGluR, (RS)-3,5- dihydrophenylglycine (DHPG), which is known to trigger glutamate exocytosis in astrocytes (Bezzi et al., 2004; Marchaland et al., submitted for publication). From our previous experiments we had calculated that DHPG, at the concentration of 100 μM , was able to induce the release of about 30–50% of VGLUT-positive SLMVs in astrocytes (Bezzi et al., 2004; Marchaland et al., submitted for publication). Here, by using low concentrations of DHPG (10–50 μM) to stimulate exocytosis, we were able to load with the FM dye just a small fraction of recycling SLMVs (about 13%, $n=15$ cells). In these conditions, we monitored and analyzed the green (EGFP) and red (FM) emissions from single double-fluorescent spots located in different cell regions. To this purpose we take advantage of two different illumination systems: the total internal reflection (TIRF) and confocal illuminations (Fig. 2B, C; Jaiswal and Simon, 2007). TIRF

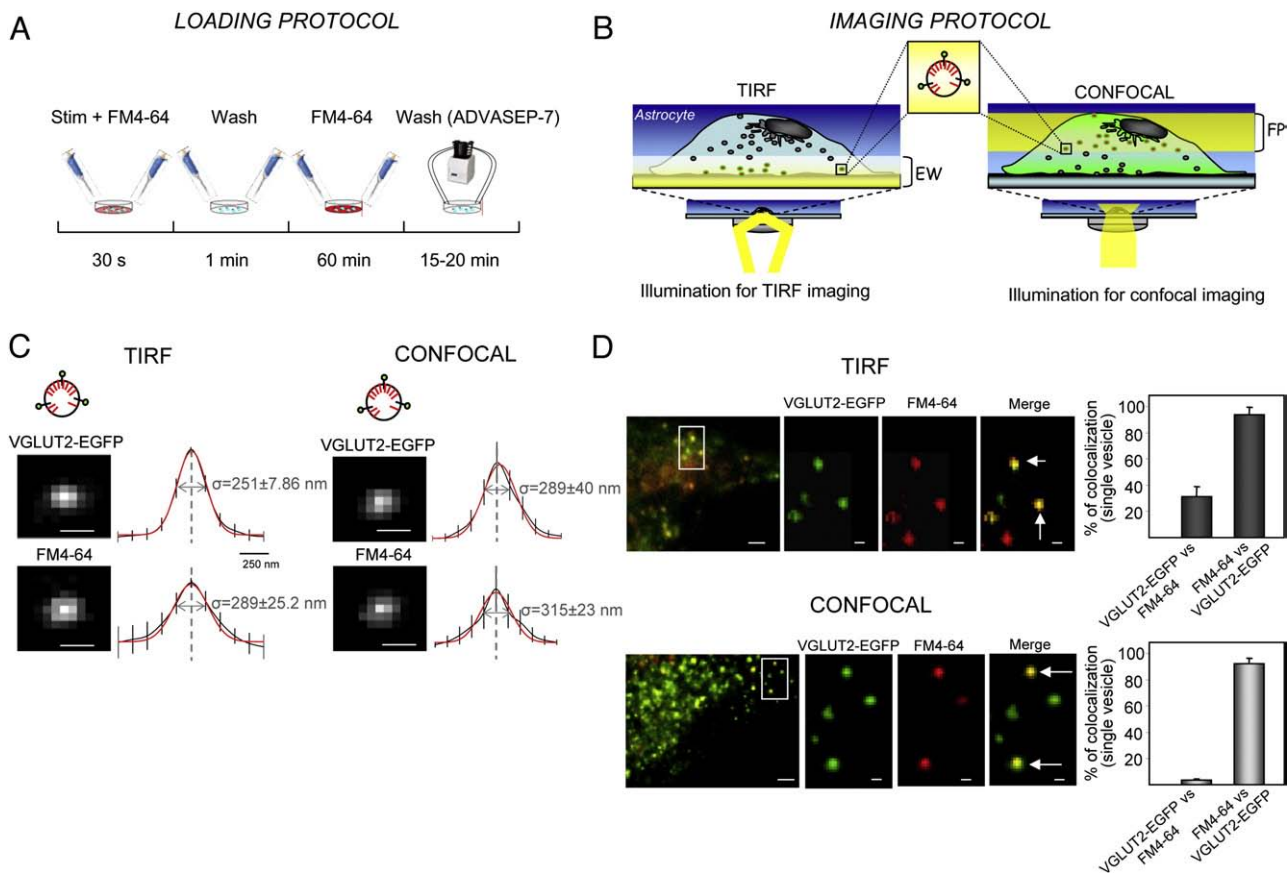


Fig. 2. Loading VGLUT-positive SLMVs with FM4-64: co-localization analysis at the single-vesicle level. Experiments were performed with TIRF and confocal illuminations. A. Loading protocol: astrocytes transfected with VGLUT2-EGFP were stimulated for 30 s with 500 μ l of buffer containing FM4-64 (15 μ M) and different concentrations of DHPG (0.01–10 mM), which is known to stimulate exocytosis and recycling of glutamatergic SLMVs in astrocytes (Bezzi et al., 2004; Marchaland et al., submitted for publication). In order to obtain the full staining of recycling SLMVs, after a brief wash astrocytes were allowed to remain in the presence of FM4-64 at 37 $^{\circ}$ C for 60 min. At the end of the loading protocol cells were superfused for 15–20 min with ADVASEPT-7 which reduces background staining of the plasma membrane with FM4-64. B. Imaging protocol: the co-localization of VGLUT and FM was performed on SLMVs located in two different cell regions by using two imaging protocols. The cartoons compare TIRF and confocal illuminations. Astrocytes expressing VGLUT2-EGFP and loaded with FM4-64, were imaged in different focal planes by TIRF (left) and confocal (right) microscopies. In TIRF microscopy, EW intensity decreases exponentially with the distance from the cover slip (or plasma membrane) and becomes negligible at a distance of about 90 nm; only double fluorescent SLMVs within this distance can be imaged. In contrast, in confocal microscopy, laser light was focused at the nucleus focal plane (FP; about 1 μ m) and excites the double fluorescent SLMVs located deep inside the cytoplasm. C. Single-vesicle comparison of double fluorescent SLMVs (expressing VGLUT2-EGFP and containing FM4-64) acquired with TIRF and confocal illuminations. On the left: TIRF images of a SLMV expressing VGLUT2-EGFP (image on top) and loaded with FM4-64 (image on bottom). Bars: 500 nm. Curves are average fluorescence profiles (or “radial sweeps”) relative to VGLUT2-EGFP (top) and FM4-64 (bottom) of 20 double fluorescent SLMVs. Red lines represent the best Gaussian fits (σ values of the curves are written on the side in grey). While the comparison of σ values between TIRF and confocal illumination did not show any significant difference, the comparison of the fluorescence distribution curves of the EGFP versus those of FM4-64 (calculated from double-fluorescent SLMVs) showed a slightly difference ($p < 0.05$, t -test). On the right: similar to the left panel of the figure but relative to confocal illumination. Bars: 500 nm. D. Co-localization of VGLUT and FM in the same vesicle. Images represent, respectively, the merging of VGLUT2-EGFP and FM4-64 fluorescence acquired with TIRF illumination (upper image) and with confocal illumination (lower image). Bars: 2 μ m. Arrows in the high magnification image indicate SLMVs that we consider as co-localized (overlapping by $\geq 2/3$); bars: 500 nm. Histograms on the right provides the estimated co-localization of VGLUT2-EGFP vs FM4-64 (TIRF: $n = 380$ SLMVs in 6 cells, confocal: $n = 382$ SLMVs in 5 cells) and of FM4-64 vs VGLUT2-EGFP (TIRF: $n = 484$ SLMVs in 5 cells, confocal: $n = 384$ SLMVs in 5 cells).

illumination exploits the so-called evanescent wave (EW) to excite ~ 90 nm of thin layer of cytosol adjacent to the plasma membrane (EW field, see cartoon in Fig. 2B); in contrast, confocal illumination obtained with a laser scanning confocal microscope illuminates an optical slice of about 1 μ m. In our experiments we focused the laser beam inside the cytoplasm, at the nuclear focal plane (see cartoon in Fig. 2B).

Images of VGLUT2-EGFP and FM spots located at the surface of the cell and inside the cytoplasm were acquired with TIRF and confocal illuminations respectively, in order to compare single-vesicle diameters under the two illumination

systems. As shown in Fig. 2C, for the σ values calculated from the radial sweeps of the same fluorophore (EGFP or FM) under TIRF and confocal illuminations, no significant difference was found (251 ± 7.86 vs 289 ± 40 for EGFP and 289 ± 25.2 vs 315 ± 23 for FM, $p > 0.05$, t -test, $n = 20$ vesicles for both); thus, an EGFP/FM spot with a diameter of about 3 pixels both under TIRF and confocal illumination corresponds to a single SLMV. Consequently, we restricted our analysis to double-labeled spots with a diameter of 3 pixels and considered them as co-localized only if overlapping for $\geq 2/3$ (6/9 pixels, Fig. 2D). The analysis provided the following results (Fig. 2D): under TIRF

illumination we found that (i) $35 \pm 7\%$ of SLMVs expressing VGLUT2-EGFP were labeled with FM4-64 and that (ii) $94 \pm 5.2\%$ of FM4-64 loaded vesicles expressed VGLUT2-EGFP; under confocal illumination (i) $9.5 \pm 1.5\%$ of VGLUT2-EGFP SLMVs were labeled with the FM4-64 dye but (ii) almost all vesicles loaded with FM4-64 ($93 \pm 4.5\%$) expressed VGLUT2-EGFP. We also noticed that when the co-localization analysis was performed >1 h after the end of FM staining, some organelles with a diameter bigger than $2 \mu\text{m}$ appeared in confocal illumination (but not in the EW field), suggesting that in the long run (hours) organelles different from SLMVs (most probably endosomes or lysosomes, data not shown, Zhang et al., 2007) somehow internalize FM. These results show that by using our staining protocol, FM dye labels mainly VGLUT-positive SLMVs.

3.2. Analysis of FM de-staining during single fusion event of VGLUT-positive SLMV

In a second series of experiments we analyzed the kinetics of FM4-64 de-staining during a single fusion event. Astrocytes

transfected with VGLUT2-EGFP and labeled with FM4-64 as above, were monitored with dual wavelength TIRF (568/488 nm, 20 Hz). We focused the real-time imaging on spontaneous exocytic events of VGLUT2-EGFP SLMVs and evaluated the FM emission intensities. Images in Fig. 3A represent a typical temporal sequence of a fusing VGLUT-positive SLMV containing FM dye. As in fusion events in neurosecretory cells (Harata et al., 2006) and neurons (Zenisek et al., 2002; Aravanis et al., 2003), the FM fluorescence first brightened (50 ms), then spread (250 ms) as the dye diffused laterally into the plasma membrane and finally disappeared (400–700 ms). The spread of the dye, in particular, indicates exocytosis as it represents the discharge of the luminal contents of the vesicle (Zenisek et al., 2000). In spite of these findings, the identification of a single fusion event with FM dye still represents a challenge. In order to define the average fluorescence identity of a single fusion event, we analyzed the de-staining of the FM dye at single-vesicle level. For each frame of the temporal fusion sequence we evaluated the “radial sweeps” (Fig. 3B) that, except for the peak relying only on a single pixel, are well described by Gaussian functions. We calculated the average “radial sweeps” from 7 fusion events (Fig. 3C), and then obtained the maximal

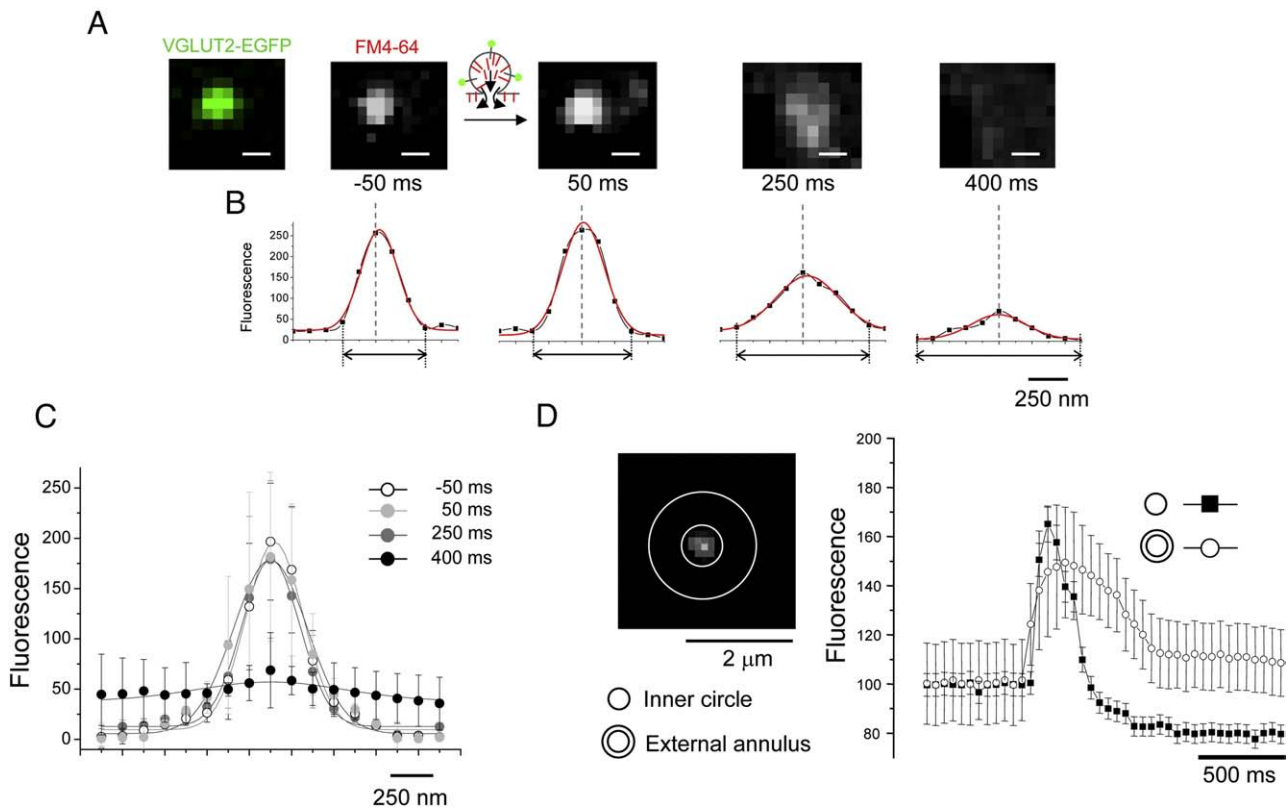


Fig. 3. Definition of a single fusion event by studying the diffusion of the FM4-64 dye during exocytosis. Experiments performed under TIRF illuminations. A. The sequence of images shows the typical exocytosis of a VGLUT-positive SLMV that is revealed by FM4-64 de-staining. The green image on the left confirms the expression of VGLUT2-EGFP. The consecutive images in grey scale represent the FM4-64 behaviour during a single fusion event. Times represent milliseconds before (-50 ms) and during (50, 250, 400 ms) the fusion event. Bars: 500 nm. B. “Radial sweeps” of the images in A calculated by plotting the FM fluorescence intensity against the distance from the center of the fluorescent spot. Red lines represent the best fits of Gaussian functions. C. Average fluorescence intensity profiles at selected times relative to spontaneous fusion events ($n=7$; back circles, 400 ms, dark gray circles, 250 ms, gray circles, 50 ms, light gray circles, -50 ms). We selected 7 fusion events from VGLUT-positive SLMVs. The curves were aligned in time to the first frame showing fusion (the one indicated with 50 ms). Fusions were determined as occurring when fluorescence was first seen to increase, then spread and disappear. D. Average kinetics of the FM4-64 fluorescence intensity during fusion events. The image represents a FM4-64 SLMV surrounded by two concentric circles ($0.756 \mu\text{m}$ and $2 \mu\text{m}$ diameters) defining a circle and annulus for the measurement of radial gradients in fluorescence. Curves represent the average kinetics of FM fluorescence intensity changes of 20 SLMVs during fusion events measured in a small circle enclosing the spot (filled squares) and in a concentric annulus around the circle (open circles).

spread of the FM dye (about 2 μm) from the points limiting the area of the Gaussian to 99% of its total. FM fluorescence spreads as the vesicle undergoes exocytosis and the dye is released. The FM dye can be however released with two different mechanisms, over the plasma membrane and into the extracellular medium. Both processes occur in ms time scale and are followed by a much slower process, the plasma membrane de-staining (Zenisek et al., 2002). For exocytosis of SLMVs in astrocytes, FM spreads into the plasma membrane rather than into the external medium since the FM4-64 does not fluoresce in aqueous buffer.

For later analysis, in which we calculated the average kinetics of the FM4-64 fluorescence intensity changes during fusion events, we positioned an enclosed circle on the FM fluorescent spot and an external annulus around the circle (Fig. 3D). We found that the FM fluorescence intensity increases in the inner circle in about two frames (112.5 ± 35 ms) and spreads in the outer annulus with a delay of about 100 ms (curves in Fig. 3D).

From the overall results we extrapolated parameters to recognize the profile of FM4-64 fluorescence during single fusion events; thus, in the following experiments, in which we investigated exocytosis processes triggered by the CXCR4 receptor, only events whose fluorescence increased in about two frames, spread and then declined over the basal level were recognized and counted as fusion events (Zenisek et al., 2002).

3.3. CXCR4 triggers exocytosis of VGLUT-positive SLMVs in astrocytes

Once the imaging protocol and the analysis method were both validated for our aims, the next challenge was to test whether the activation of CXCR4 receptor triggered the exocytosis of glutammatergic SLMVs in astrocytes.

In this set of experiments we assured FM loading of almost all VGLUT-expressing SLMVs by stimulating exo-endocytosis

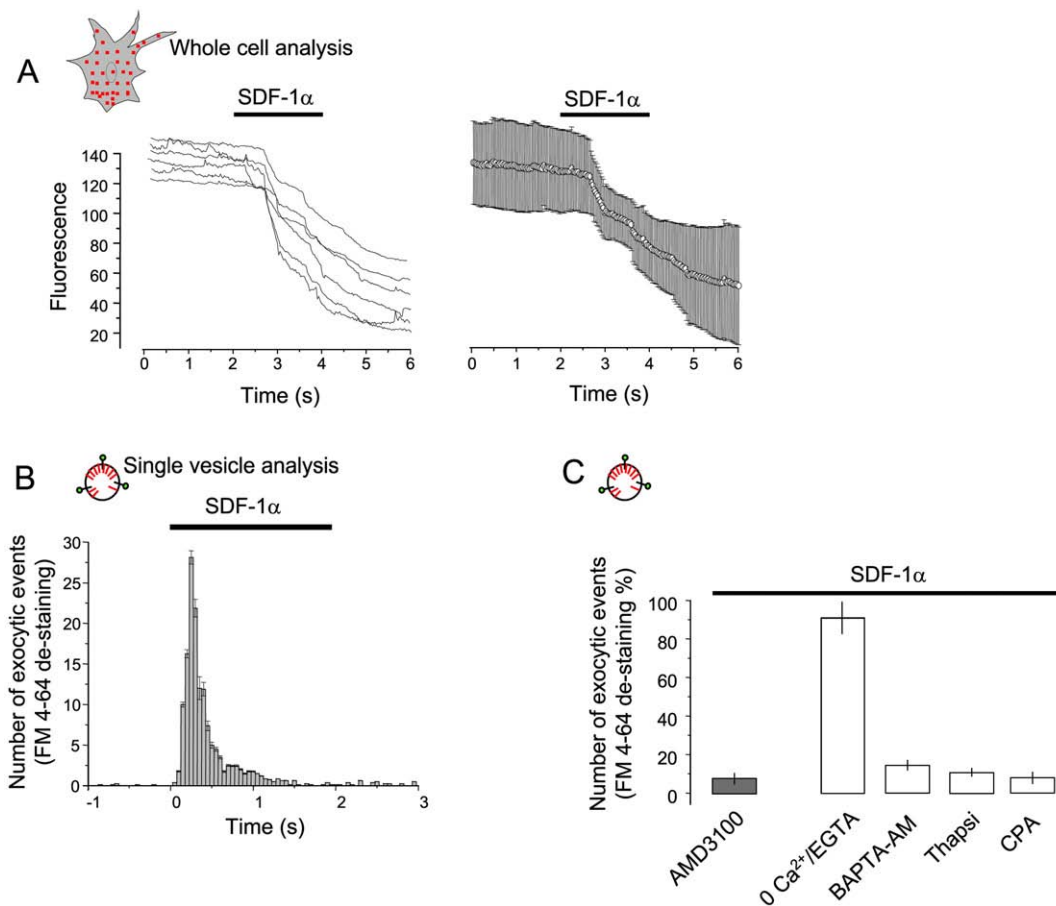


Fig. 4. SDF-1 α triggers exocytosis of VGLUT-positive SLMVs in a burst. Properties of SDF-1 α evoked exocytosis of VGLUT2-EGFP SLMVs studied with TIRF imaging. A. The cartoon represents our method of analysis; the entire profile of an astrocyte (transfected with VGLUT2-EGFP and loaded with FM4-64) appearing in the field of view under TIRF illumination has been selected for analysis (whole cell analysis). On the left: curves represent typical FM4-64 fluorescence signals from 6 different astrocytes 2 s before, during and after SDF-1 α application (3 nM). Each curve shows the destaining kinetic of FM4-64 from the whole cell perimeter of an astrocyte. On the right: average of the whole-astrocyte FM de-staining before, during and after SDF-1 α ($n=8$ cells). B–C. Single-vesicle analysis of fusion events evoked by SDF-1 α application (2 s, 3 nM). B. Temporal distribution of fusion events obtained by plotting the number of fusions (counted as FM4-64 de-staining) against time. Each individual histogram represents the number (mean \pm SD) of fusion events detected in a 50 ms-long frame ($n=14$ cells). C. CXCR4 and Ca²⁺ dependency of SDF-1 α -evoked exocytosis. Fusion events are reduced to the basal level (CTRL) if astrocytes were stimulated in the presence of AMD3100 (100 ng/ml, $n=5$ cells), were pre-incubated with BAPTA/AM (50 μM , $n=5$ cells), with thapsigargin (Thapsi 50 nM, 20 min; $n=6$ cells) or with cyclopiazonic acid (CPA 10 μM , 15 min; $n=6$ cells). In contrast, the absence of external Ca²⁺ (0 Ca²⁺ with 5 mM of EGTA; $n=5$ cells) failed to produce any significant effect.

processes with high concentrations of DHPG (1–10 mM). By using double wavelength TIRF illumination (488/568 nm; 20 Hz) we then monitored VGLUT-positive and FM-labeled SLMVs exocytosis by stimulating cells with a brief (2 s) localized perfusion of the CXCR4 natural ligand SDF-1 α (or CXCL12, 3 nM), which is known to stimulate glutamate release from both tissue and cultured astrocytes (Bezzi et al., 2001). The analysis was first performed by putting a region of interest around the whole cell perimeter and calculating the average sub-membrane fluorescence signal (F) in 2 s periods before, during and after stimulation with SDF-1 α . In the presence of SDF-1 α , as well as in the first 2 s after the end of the stimulus, F was significantly lower than in the period immediately preceding the stimulation, suggesting that CXCR4 activation triggered exocytosis and, consequently, the release of FM dye from SLMVs (Fig. 4A; SDF-1 α : $32.4 \pm 18.5 F$; before: $87.5 \pm 8.7 F$; after: $8.7 \pm 5.6 F$; $n=8$ cells; $p < 0.05$; m-ANOVA). We then proceeded with the analysis at the single fusion event level. By means of a retrospective analysis, we centered the circle and the annulus on each EGFP spot located in the EW field (including those present before the stimulus and those appearing after the stimulus); then, by switching in the red channel, we analyzed the destaining of FM fluorescence. Only the FM4-64 fluorescence events with morphology similar to that previously described (Fig. 4B) were counted as fusion event. Histograms in Fig. 4B, obtained by plotting against time the number of fusion events counted in 50-ms time frames, show the profile of exocytosis triggered by SDF-1 α . Fusion events were rare (1.2 s^{-1}) in the absence of SDF-1 α , but increased immediately after its application to reach the maximal fusion rate (208 s^{-1}) in 500 ms. Then, fusion events gradually declined and slowly returned to basal level in about 4 s. When saline buffer was applied instead of SDF-1 α , almost no increase in the number of FM de-staining was observed (1.5 s^{-1} , $p > 0.05$, t -test, $n=5$). Further characterization of the exocytic process was obtained by following the vesicular marker VGLUT2-EGFP; 400 ms after undergoing an FM de-staining in response to the SDF-1 α , green spots classified as VGLUT2-EGFP positive SLMVs showed two distinct fates: $36 \pm 9\%$ disappeared, whereas $62 \pm 8\%$ clearly remained in place and showed no significant change in fluorescence intensity.

The demonstration that the response to SDF-1 α is highly specific (Fig. 4C) came from a second series of experiments, in which we pre-incubated cells with a specific CXCR4 antagonist or with blockers of intracellular and external Ca^{2+} . Indeed, we found that fusion events were almost abolished: (i) in the presence of the CXCR4 antagonist AMD3100 ($-92 \pm 7\%$); (ii) in cells preloaded with a general chelator of [Ca^{2+}] $_i$ BAPTA/AM ($-87 \pm 5.8\%$); (iii) in the presence of inhibitors of the ER Ca^{2+} -ATPase (thapsigargin: $-95 \pm 5\%$; cyclopiazonic acid, CPA: $-92 \pm 6\%$, respectively, Fig. 4C), but not (iv) when we performed the experiments in the absence of external Ca^{2+} ($0\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$: $3.5 \pm 0.45\%$).

4. Discussion

This work describes the CXCR4-mediated signalling pathway leading to glutamate exocytosis in astrocytes. Glutamate release

from astrocytes in response to SDF-1 α has been reported both in primary cultures and in tissue in a previous work (Bezzi et al., 2001). The underlying Ca^{2+} -dependent signaling and the spatial-temporal features of the release were however not investigated. Here, thanks to the limited penetration of the EW illumination in TIRF microscopy, we directly visualized and monitored the CXCR4-dependent exocytosis of glutamatergic SLMVs at single-vesicle level, and defined several aspects of this process. The most important challenge was to setup a method for selective labelling of glutamatergic SLMVs with a stable marker of exocytosis. To this aim we adapted to astrocytes a recently developed approach set up to load and monitor recycling SVs at synaptic boutons (Zenisek et al., 2002; Harata et al., 2001; Aravanis et al., 2003). By perfusing astrocytes expressing fluorescent glutamatergic SLMVs (*i.e.* VGLUT2-EGFP vesicles) with different concentrations of an agonist of mGluR group I (DHPG 0.01–10 mM), we selectively loaded recycling vesicles with the red fluorescent styryl dye FM4-64. The co-localization of FM4-64 and VGLUT2-EGFP in recycling SLMVs was examined at the single-vesicle level by combining two imaging approaches. By means of TIRF illumination we monitored the double-fluorescent SLMVs lying in the EW field immediately adjacent to the astrocytes plasma membrane (about 90 nm in our setup), most likely representing docked vesicles; in contrast, confocal illumination showed double-fluorescent SLMVs that were recycled inside the cytoplasm. The loading protocol and the single-vesicle analysis chosen in our study provided detailed information about the recycling processes. We found that glutamatergic SLMVs storing the FM dye underwent recycling processes in different cellular compartments. Indeed, about 65% of double fluorescent SLMVs, most likely representing those undergoing a local recycling (such as kiss-and-run or kiss and stay, Harata et al., 2006), remain in proximity of the plasma membrane; the remaining 35%, most likely representing those undergoing an intra-cytoplasmic recycling (such as clathrin-coat-dependent process or bulk retrieval, Rizzoli and Jahn, 2007), were instead found deep in the cytoplasm. These results suggest that astrocytes, like neurons and neurosecretory cells, show at least two modes of exocytosis and recycling processes (Chen et al., 2005; Marchaland et al., submitted for publication). The double fluorescent SLMVs monitored with both TIRF and confocal illuminations had average diameters of about 3 pixels (~ 378 nm), thus compatible with those of SVs visualized with TIRF microscopy (Zenisek et al., 2000) and coherent with the diameters of astrocytic SLMVs identified in hippocampal tissue by electron microscopy (Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007).

Single fusion events of glutamatergic SLMVs have been monitored by following FM4-64 de-staining, a sequence of stereotyped fluorescence intensity changes well characterized for SVs (Zenisek et al., 2002; Harata et al., 2001). By combining TIRF illumination and FM de-staining we could directly monitor the exocytosis of individual VGLUT-positive SLMVs and collect information on the secretory process triggered by CXCR4 receptor activation. Secretion occurred as a burst of exocytosis, with the rate of fusion events increasing up to 174-fold over the basal level in the first 500 ms. During the exocytic burst, about 57% of SLMVs that were present in the EW field before the

stimulus underwent exocytosis in about 4 s. Exocytosis triggered by SDF-1 α was mediated by the activation of CXCR4 receptors and involved the release of Ca²⁺ from internal stores, consistent with the reported coupling of CXCR4 receptor with 1,4,5-triphosphate-dependent (IP3)-dependent intracellular Ca²⁺ elevations (Zheng et al., 1999a,b).

One important peculiarity of the CXCR4-mediated stimulus-secretion coupling that leads to SLMVs exocytosis is its rapidity. It occurs with a relatively fast time scale in the order of few hundred milliseconds, longer than what recorded in synaptic vesicles but analogous to events reported for clear vesicles of neurosecretory cells (Kasai et al., 1999). Interestingly, the exocytic burst unfolds in a time scale much shorter than that of dense-core granules in neurosecretory cells, which are governed by voltage gated Ca²⁺ channels (VGCCs; Kasai et al., 1999). Taking into account that astrocytes are electrically non-excitabile and thus exocytosis in these cells cannot be triggered by the opening of strategically distributed VGCCs (Carmignoto et al., 1998), our results are remarkable. Indeed, the kinetics of the stimulus-secretion coupling differs enormously among secretory cell types, but in non-electrically excitable cells the process is usually much slower than in excitable cells (Chow et al., 1994; Chow et al., 1996; Kasai, 1999). One of the main reasons is that non-excitabile cells, similarly to astrocytes, rely only on the activation of GPCRs, a signalling pathway that involves signalling steps necessary to release Ca²⁺ from the internal stores. Our results indicates that the exocytosis time scale in response to GPCR stimulation in astrocytes is remarkably faster than in any other non-excitabile cell (Bezzi et al., 2004; Marchaland et al., submitted for publication). The GPCR-mediated signalling pathway that leads to the fast exocytic burst remains to be established.

Our results are consistent with a recently proposed role for chemokines as neurotransmitters or neuromodulators in the fast brain signalling (Rostene et al., 2007). In dopaminergic and cholinergic neurons, for instance, SDF-1 α is constitutively expressed in dense-core granules at synaptic terminals (Banisadr et al., 2003; Callewaere et al., 2006), suggesting that neurons might release SDF-1 α in response to synaptic activity (Rostene et al., 2007). On the other hand, molecular and immunohistochemical studies have shown that the CXCR4 receptor is highly expressed in both neuronal and glial cells of the rodent embryonic brain (Jazin et al., 1997; McGrath et al., 1999). Moreover, in the adult rodent brain, it is constitutively expressed in presynaptic terminals of neurons containing SDF-1 α (Banisadr et al., 2002) as well as in GFAP-positive cells (most probably astrocytes) in the hippocampal dentate gyrus (Tran et al., 2007). In view of our results and the strategic localization of SDF-1 α and its receptors, it is intriguing to speculate that the SDF-1 α /CXCR4 system might be involved in a fast bidirectional communication system between astrocytes and neurons.

Acknowledgements

We thank O. Mirante and the Center of Imaging Facility (CIF) University of Lausanne for the experimental support;

S. Vesce and M. Santello for their scientific discussion and comments on the manuscript. This work was supported by FBM grant 2006 to Paola Bezzi.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jneuroim.2008.04.015.

References

- Aravanis, A.M., Pyle, J.L., Tsien, R.W., 2003. Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* 423, 643–647.
- Asensio, V.C., Campbell, I.L., 1999. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci.* 22, 504–512.
- Avery, J., Ellis, D.J., Lang, T., Holroyd, P., Riedel, D., Henderson, R.M., Edwardson, J.M., Jahn, R., 2000. A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 148, 317–324.
- Banisadr, G., Fontanges, P., Haour, F., Kitabgi, P., Rostene, W., Melik Parsadaniantz, S., 2002. Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1661–1671.
- Banisadr, G., Skrzydelski, D., Kitabgi, P., Rostene, W., Parsadaniantz, S.M., 2003. Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1593–1606.
- Berger, E.A., Murphy, P.M., Farber, J.M., 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657–700.
- Betz, W.J., Bewick, G.S., 1992. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255, 200–203.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A., 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagnetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., Volterra, A., 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 4, 702–710.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E., Volterra, A., 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 7, 613–620.
- Callewaere, C., Banisadr, G., Desarmenien, M.G., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostene, W.H., Melik Parsadaniantz, S., 2006. The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8221–8226.
- Carmignoto, G., Pasti, L., Pozzan, T., 1998. On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 18, 4637–4645.
- Chen, X., Wang, L., Zhou, Y., Zheng, L.H., Zhou, Z., 2005. "Kiss-and-run" glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 9236–9243.
- Cheviet, S., Bezzi, P., Ivarsson, R., Renstrom, E., Viertl, D., Kasas, S., Catsicas, S., Regazzi, R., 2006. Tomosyn-1 is involved in a post-docking event required for pancreatic beta-cell exocytosis. *J. Cell Sci.* 119, 2912–2920.
- Chow, R.H., Klingauf, J., Neher, E., 1994. Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12765–12769.
- Chow, R.H., Klingauf, J., Heinemann, C., Zucker, R.S., Neher, E., 1996. Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells. *Neuron* 16, 369–376.
- Corasaniti, M.T., Bagnetta, G., Rotiroti, D., Nisticò, G., 1998. The HIV envelope protein gp120 in the nervous system: interactions with nitric oxide, interleukin-1 β and nerve growth factor signalling, with pathological implications in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 56, 153–156.

- Corasaniti, M.T., Maccarrone, M., Nistico, R., Malorni, W., Rotiroti, D., Bagetta, G., 2001. Exploitation of the HIV-1 coat glycoprotein, gp120, in neurodegenerative studies in vivo. *J. Neurochem.* 79, 1–8.
- Corasaniti, M.T., Rotiroti, D., Nappi, G., Bagetta, G., 2003. Neurobiological mediators of neuronal apoptosis in experimental neuroAIDS. *Toxicol. Lett.* 139, 199–206.
- Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A., Bezzi, P., 2006. P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor- α and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 281, 30684–30696.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., Carmignoto, G., 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2006. Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54, 676–690.
- Harata, N., Pyle, J.L., Aravanis, A.M., Mozhayeva, M., Kavalali, E.T., Tsien, R.W., 2001. Limited numbers of recycling vesicles in small CNS nerve terminals: implications for neural signaling and vesicular cycling. *Trends Neurosci.* 24, 637–643.
- Harata, N.C., Aravanis, A.M., Tsien, R.W., 2006. Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J. Neurochem.* 97, 1546–1570.
- Jaiswal, J.K., Simon, S.M., 2007. Imaging single events at the cell membrane. *Nat. Chem. Biol.* 3, 92–98.
- Jazin, E.E., Soderstrom, S., Ebendal, T., Larhammar, D., 1997. Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor. *J. Neuroimmunol.* 79, 148–154.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., Volterra, A., 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10, 331–339.
- Kasai, H., 1999. Comparative biology of Ca²⁺-dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function. *Trends Neurosci.* 22, 88–93.
- Kasai, H., Kishimoto, T., Liu, T.T., Miyashita, Y., Podini, P., Grohovaz, F., Meldolesi, J., 1999. Multiple and diverse forms of regulated exocytosis in wild-type and defective PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 945–949.
- Kaul, M., Garden, G.A., Lipton, S.A., 2001. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 410, 988–994.
- Kreft, M., Stenovec, M., Rupnik, M., Grile, S., Krzan, M., Potokar, M., Pangrsic, T., Haydon, P.G., Zorec, R., 2004. Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia* 46, 437–445.
- Limatola, C., Giovannelli, A., Maggi, L., Ragozzino, D., Castellani, L., Ciotti, M.T., Vacca, F., Mercanti, D., Santoni, A., Eusebi, F., 2000. SDF-1 α -mediated modulation of synaptic transmission in rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2497–2504.
- Marchaland, J., Cali, C., Voglmaier, S.M., Li, H., Regazzi, R., Edwards, R.H., Bezzi, P., submitted for publication. Fast sub-plasma membrane Ca²⁺ transients control exo-endocytosis of SLMVs in astrocytes.
- McGrath, K.E., Koniski, A.D., Maltby, K.M., McGann, J.K., Palis, J., 1999. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev. Biol.* 213, 442–456.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., Haydon, P.G., 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Perea, G., Araque, A., 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083–1086.
- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I.F., Limatola, C., Eusebi, F., 2006. Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 26, 10488–10498.
- Richards, D.A., Mateos, J.M., Hugel, S., de Paola, V., Caroni, P., Gähwiler, B.H., McKinney, R.A., 2005. Glutamate induces the rapid formation of spine head protrusions in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6166–6171.
- Rizzoli, S.O., Jahn, R., 2007. Kiss-and-run, collapse and ‘readily retrievable’ vesicles. *Traffic* 8, 1137–1144.
- Rossi, D., Zlotnik, A., 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217–242.
- Rostene, W., Kitabgi, P., Parsadaniantz, S.M., 2007. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 895–903.
- Sanzgiri, R.P., Araque, A., Haydon, P.G., 1999. Prostaglandin E(2) stimulates glutamate receptor-dependent astrocyte neuromodulation in cultured hippocampal cells. *J. Neurobiol.* 41, 221–229.
- Skrzydelski, D., Guyon, A., Dauge, V., Rovere, C., Apartis, E., Kitabgi, P., Nahon, J.L., Rostene, W., Parsadaniantz, S.M., 2007. The chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 activates the nigrostriatal dopamine system. *J. Neurochem.* 102, 1175–1183.
- Steyer, J.A., Almers, W., 2001. A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 268–275.
- Steyer, J.A., Horstmann, H., Almers, W., 1997. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388, 474–478.
- Tran, P.B., Banisadr, G., Ren, D., Chenn, A., Miller, R.J., 2007. Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 500, 1007–1033.
- Volterra, A., Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640.
- Zenisek, D., Steyer, J.A., Almers, W., 2000. Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406, 849–854.
- Zenisek, D., Steyer, J.A., Feldman, M.E., Almers, W., 2002. A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron* 35, 1085–1097.
- Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., Haydon, P.G., 2004. Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9441–9446.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X.S., Duan, S., 2007. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 945–953.
- Zheng, J., Ghorpade, A., Niemann, D., Cotter, R.L., Thylin, M.R., Epstein, L., Swartz, J.M., Shepard, R.B., Liu, X., Nukuna, A., Gendelman, H.E., 1999a. Lymphotropic virions affect chemokine receptor-mediated neural signaling and apoptosis: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia. *J. Virol.* 73, 8256–8267.
- Zheng, J., Thylin, M.R., Ghorpade, A., Xiong, H., Persidsky, Y., Cotter, R., Niemann, D., Che, M., Zeng, Y.C., Gelbard, H.A., Shepard, R.B., Swartz, J.M., Gendelman, H.E., 1999b. Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia. *J. Neuroimmunol.* 98, 185–200.

2.3. Fast subplasma membrane Ca²⁺ transients control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes. *J. of Neurosci.*

2.3.1. Finalité de l'article

Dans ce second article, nous avons adapté, en collaboration avec le Prof. R. Edwards (UCSF, USA), expert des mécanismes de la sécrétion régulée dans les cellules nerveuses, une stratégie récemment développée pour l'étude de l'exocytose, de l'endocytose et du recyclage des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons neuronales pour suivre la sécrétion régulée des SLMVs glutamatergiques des astrocytes. Cette stratégie expérimentale consiste à combiner l'utilisation d'une forme modifiée de la GFP, la pHluorin, dont la fluorescence est particulièrement sensible au pH avec une technique d'imagerie particulièrement performante pour suivre de manière dynamique la sécrétion régulée, la microscopie TIRF. Nous avons du modifier et adapter la méthode pour suivre, à l'échelle de la vésicule et à l'échelle de la cellule, les processus d'exocytose, d'endocytose et de recyclage des SLMVs glutamatergiques des astrocytes. Nous avons également obtenu des informations importantes sur la signalisation calcique supportant la sécrétion régulée avec une précision temporelle et spatiale sans précédent. Cette étude propose une description détaillée des propriétés dynamiques de la sécrétion et du couplage stimulus/sécrétion des astrocytes et supporte l'implication de la sécrétion régulée des astrocytes dans une communication rapide entre les différentes cellules cérébrales.

2.3.2. Participation personnelle

Dans ce second article, je suis également co-auteur avec Corrado Cali.

Nous avons également pour ce projet unis nos compétences pour pouvoir mettre en place cette stratégie particulièrement innovante et exigeante. Nous avons réalisé la plupart des expériences soit en binôme soit en parallèle. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit.

Cette étude a été publiée dans la revue *Journal of Neuroscience*.

A la suite cet article, vous trouverez les figures supplémentaires qui lui ont été associées lors de la publication.

Fast Subplasma Membrane Ca^{2+} Transients Control Exo-Endocytosis of Synaptic-Like Microvesicles in Astrocytes

Julie Marchaland,^{1*} Corrado Cali,^{1*} Susan M. Voglmaier,³ Haiyan Li,² Romano Regazzi,¹ Robert H. Edwards,² and Paola Bezzi¹

¹Department of Cell Biology and Morphology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, 1005 Lausanne, Switzerland, and Departments of ²Neurology and Physiology and ³Psychiatry, University of California, San Francisco, San Francisco, California 94143

Astrocytes are the most abundant glial cell type in the brain. Although not apposite for long-range rapid electrical communication, astrocytes share with neurons the capacity of chemical signaling via Ca^{2+} -dependent transmitter exocytosis. Despite this recent finding, little is known about the specific properties of regulated secretion and vesicle recycling in astrocytes. Important differences may exist with the neuronal exocytosis, starting from the fact that stimulus-secretion coupling in astrocytes is voltage independent, mediated by G-protein-coupled receptors and the release of Ca^{2+} from internal stores. Elucidating the spatiotemporal properties of astrocytic exo-endocytosis is, therefore, of primary importance for understanding the mode of communication of these cells and their role in brain signaling. We here take advantage of fluorescent tools recently developed for studying recycling of glutamatergic vesicles at synapses (Voglmaier et al., 2006; Balaji and Ryan, 2007); we combine epifluorescence and total internal reflection fluorescence imaging to investigate with unprecedented temporal and spatial resolution, the stimulus-secretion coupling underlying exo-endocytosis of glutamatergic synaptic-like microvesicles (SLMVs) in astrocytes. Our main findings indicate that (1) exo-endocytosis in astrocytes proceeds with a time course on the millisecond time scale ($\tau_{\text{exocytosis}} = 0.24 \pm 0.017$ s; $\tau_{\text{endocytosis}} = 0.26 \pm 0.03$ s) and (2) exocytosis is controlled by local Ca^{2+} microdomains. We identified submicrometer cytosolic compartments delimited by endoplasmic reticulum tubuli reaching beneath the plasma membrane and containing SLMVs at which fast (time-to-peak, ~ 50 ms) Ca^{2+} events occurred in precise spatial-temporal correlation with exocytic fusion events. Overall, the above characteristics of transmitter exocytosis from astrocytes support a role of this process in fast synaptic modulation.

Key words: exocytosis; endocytosis; calcium; glutamate release; astrocytes; imaging

Introduction

Increasing evidence indicates that astrocytes are competent for regulated exocytosis and play a role in intercellular communication in the brain [for review, see Volterra and Meldolesi (2005) and Haydon and Carmignoto (2006)]. By responding to environmental stimuli with intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) elevations and release of chemical transmitters (gliotransmitters) (Bezzi and Volterra, 2001), astrocytes are in the position to exchange a large variety of regulatory signals with surrounding cells. These findings constitute a conceptual breakthrough, although more work is needed to establish the exact contribution of astrocyte signaling to specific brain processes. A major obstacle to achieving this goal is the lack of a detailed description of the basic cell biological

properties of astrocytes. The secretory aspect is a typical example. There is accumulating evidence that astrocytes secrete numerous transmitters by Ca^{2+} -dependent exocytosis (Bezzi et al., 2004; Zhang et al., 2004; Chen et al., 2005; Domercq et al., 2006; Bowser and Khakh 2007; Nadrigny et al., 2007). However, the available data are far from giving a complete and coherent description of the properties of the exo-endocytosis processes in astrocytes. Critical information is missing concerning the spatial-temporal characteristics of exocytosis, endocytosis recycling, and the underlying stimulus-secretion coupling mechanism. Moreover, further uncertainty is created by the emerging heterogeneity of the secretory pathways in astrocytes. Various types of organelles have been proposed to underlie exocytosis of gliotransmitters: from synaptic-like microvesicles (SLMVs) (Bezzi et al., 2004; Crippa et al., 2006; Jourdain et al., 2007), to dense-core granules (Coco et al., 2003; Striedinger et al., 2007), to lysosomes (Zhang et al., 2007), and to extra-large organelles with several μm long diameter (Xu et al., 2007). Past studies have not taken into account such heterogeneity. As a consequence, their descriptions of astrocytic secretion are probably not fully accurate, mixing contributions by more than one exocytic organelle population (Chen et al., 2005; Bowser and Khakh, 2007; Jaiswal et al., 2007; Nadrigny et al., 2007; Xu et al., 2007). Among the organelles putatively secreting gliotransmitters, glutamatergic SLMVs are

Received Jan. 4, 2008; revised July 22, 2008; accepted July 28, 2008.

This work was supported by a Faculty of Biology and Medicine 2006 grant, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland (P.B.). We thank R. Tsien for providing the mCherry construct and N. Demaurex for providing the ER-GFP; O. Mirante and P. Spagnuolo for experimental support; M. Giugliano, S. Vesce, V. Schubert, and M. Santello for scientific discussions; and J. Meldolesi, O. Kochubey, N. Korogod, and A. Volterra for comments and revisions on this manuscript.

*J.M. and C.C. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Dr. Paola Bezzi, Department of Cell Biology and Morphology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Rue du Bugnon 9, 1005 Lausanne, Switzerland. E-mail: Paola.Bezzi@unil.ch.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0040-08.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/289122-11\$15.00/0

the best and most extensively characterized. They have been identified both in adult brain tissue and in cell culture and studied at the ultrastructural as well as functional level (Bezzi et al., 2004; Crippa et al., 2006; Jourdain et al., 2007; Ni et al., 2007).

To define the specific characteristics of exo-endocytosis of glutamatergic SLMVs, we apply for the first time in astrocytes a strategy recently developed for studying the dynamics of glutamatergic synaptic vesicles (SVs) at synapses (Voglmaier et al., 2006). This consists of using the chimerical protein vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)-pHluorin in combination with epifluorescence (EPI) and total internal reflection fluorescence (TIRF) illuminations (EPIi; TIRFi). VGLUT1-pHluorin combines the SLMV-specific targeting ensured by VGLUT1 to the properties of super-ecliptic pHluorin, a green fluorescent protein (GFP) with modified pH sensitivity (Miesenböck et al., 1998; Ryan and Reuter, 2001). When attached to the luminal domain of a vesicle resident protein, pHluorin allows a direct detection of fusion and retrieval of single vesicles (Sankaranarayanan and Ryan, 2000; Balaji and Ryan, 2007).

By using EPIi and TIRFi to monitor exo-endocytosis, respectively, at the whole-cell level and at the single-vesicle level, and dual-wavelength TIRF imaging for monitoring in parallel submembrane Ca^{2+} and SLMV dynamics, our study aims at (1) obtaining the first accurate kinetic description of exocytosis and endocytosis of astrocytic SLMVs and (2) defining the spatial-temporal characteristics of the underlying stimulus-secretion coupling mechanism.

Materials and Methods

Pharmacological agents, constructs, and transfection. All agents were from Sigma-Aldrich, unless otherwise indicated. Plasmids containing the VGLUT1-pHluorin and VGLUT1-mCherry constructs were prepared as described previously (Voglmaier et al., 2006); the endoplasmic reticulum (ER)-GFP plasmid was kindly provided by N. Demareux (University of Geneva, Geneva, Switzerland) (Demareux and Frieden, 2003). Each of these plasmids (0.5 μg for single transfection experiments or 0.25 μg for double transfection experiments) was transfected into primary rat cortical astrocytes cultures with FuGene6 (3 μl ; Roche Diagnostics).

Astrocyte cultures for imaging experiments. Astrocyte cultures containing >99% GFAP-positive cells ($\leq 8\%$ of which positive for the neural precursor marker LeX) were obtained from newborn rats. They were prepared as described previously (Bezzi et al., 2001), plated (2.5×10^4 cells) on glass coverslip and transfected 6–8 d later with VGLUT1-pHluorin, VGLUT1-mCherry or ER-GFP constructs. The double transfection protocol with VGLUT1-pHluorin and VGLUT1-mCherry resulted in an almost complete colocalization of the two fluorescent proteins ($85 \pm 11\%$). After transfection (2–5 d), coverslips were mounted in the open laminar flow perfusion incubator at 37°C (Harvard Apparatus) on the stage of a Zeiss Axiovert 200 fluorescence inverted microscope modified for TIRF and EPI experiments (Visitron System). The experimental chamber (250 μl volume) was perfused at a rate of 1–1.5 ml/min. The stimulus [(RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG); Tocris Bioscience] was applied rapidly (2 s) via a software-controlled microperfusion fast-step device (100 $\mu\text{l}/\text{min}$; Warner Instruments). Cells were perfused at 37°C in a HEPES-Krebs-Ringer HEPES (KRH) buffer containing (in mM) 120 NaCl, 3.1 KCl, 2 MgCl_2 , 1.8 CaCl_2 , 1.25 NaH_2PO_4 , 25 HEPES-Na (buffered to pH 7.4), glucose 4. Bafilomycin A1 (Baf A1) (Calbiochem) was used at a final concentration of 5 μM (diluted with HEPES-KRH) and incubated for 7–10 min before the stimulus. In experiments with thapsigargin (thapsi) or cyclopiazonic acid (CPA) (Calbiochem), the drugs were diluted in HEPES-KRH, incubated for 15–20 min, and the stimulus was subsequently applied when the Ca^{2+} signal recovered to basal level. SLMVs expressing VGLUT1-pHluorin were labeled by DHPG (2 s, 100 μM) in saline containing 15 μM FM 4–64 (Invitrogen).

For Ca^{2+} imaging experiments, cells (transfected or not transfected)

were loaded with 5 μM of Fluo4 AM (Invitrogen) for 15 min or with 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of x-rhod-1 AM (Invitrogen) for 10 min in the presence of 0.02% pluronic F-127 (Invitrogen) at room temperature in the dark in a HEPES-KRH buffer, pH 7.4, and then de-esterified for 10–15 min before imaging.

Optical imaging. EPIi or TIRFi were alternatively used for our experiments. EPIi and TIRFi were alternated in real time for whole-cell pHluorin fluorescence (pHF) signal measurements in individual cells, in basal conditions and upon stimulation with DHPG. By imaging with excitation light at 488 nm generated by a 488 nm laser (20 mW; Laserphysics) and by a polychromator illumination system (Visichrome), the pHF signal was recorded at 10 Hz through a $100\times$ objective lens (Zeiss; α -plan FLUAR 100X, 1.45 NA) and filtered with Zeiss filter set 10 (Zeiss).

TIRFi was used for all of the remaining experiments. The expanded beam of a 488/568 nm argon/krypton multiline laser (20 mW; Laserphysics) passed through an acousto-optic tunable filter laser wavelength selector (VisiTech International) synchronized with a soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein-HQ charge-coupled device camera (Roper Scientific) under Metafluor software (Universal Imaging) control and was introduced to the coverslip from the high numerical aperture objective lens (α -plan FLUAR 100X; Zeiss). Light entered the coverslip and underwent total internal reflection at the glass-cell interface. In our experimental conditions, penetration depth of TIRFi was calculated by following, with some modifications, the method setup by Mattheyses and Axelrod (2006) to be ~ 92.12 nm. In single-wavelength TIRFi experiments (488 nm), the laser beam was filtered via the Zeiss filter set 10, and images were acquired at 20–40 Hz (Zeiss). In dual-wavelength TIRF illumination (488/568 nm), laser beams were combined by a dichroic mirror from the Zeiss filter set 24 at 20–40 Hz. In TIRFi experiments, at which we monitored $[\text{Ca}^{2+}]_i$ events as fast as possible (40 Hz), we restricted analysis to 10 regions of interest (ROIs) per cell located at different subdomains (i.e., in the processes and cell body). The pixel size was 126 nm (at binning 2).

Image analysis. Video images, digitized with MetaFluor, were analyzed with MetaMorph software (Universal Imaging). For details, refer to supplemental information, available at www.jneurosci.org as supplemental material.

Results

Kinetics of exo-endocytosis and reacidification of SLMVs in astrocytes

To study exo-endocytosis of astrocytic glutamatergic SLMVs, we transiently expressed VGLUT1-pHluorin in cultured astrocytes. Confocal analysis of the intracellular distribution of the VGLUT1-pHluorin showed that the protein mainly colocalized with endogenous cellubrevin (>90%) (supplemental Fig. 1 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material), endogenous glutamate (supplemental Fig. 3 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material), and partially overlapped with early or recycling endosomes (~ 20 and 30%, respectively), *trans*-Golgi network ($\sim 8\%$), and late endosomes/lysosomes ($\sim 6\%$) (Fig. 2 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). By combining EPIi and TIRFi (10 Hz), we monitored pHF changes under basal conditions and upon stimulation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR) via local application of the specific agonist DHPG. The use of EPIi in real time with TIRFi was aimed at providing a comparative analysis of pHF changes in the whole cell and in its submembrane compartment. The sequence of images in Figure 1A shows that, under basal conditions, the pHF signal is very low both under TIRFi and EPIi; only a few fluorescent spots are visible, representing vesicles undergoing spontaneous discharge. Application of DHPG (100 μM , 2 s), which is known to trigger glutamate release from astrocytes (Bezzi et al., 1998, 2004), causes a rapid and transient increase in pHF consistent with exposure of the pHluorin epitope to the external pH (~ 7.4) in coincidence with vesicular fusions

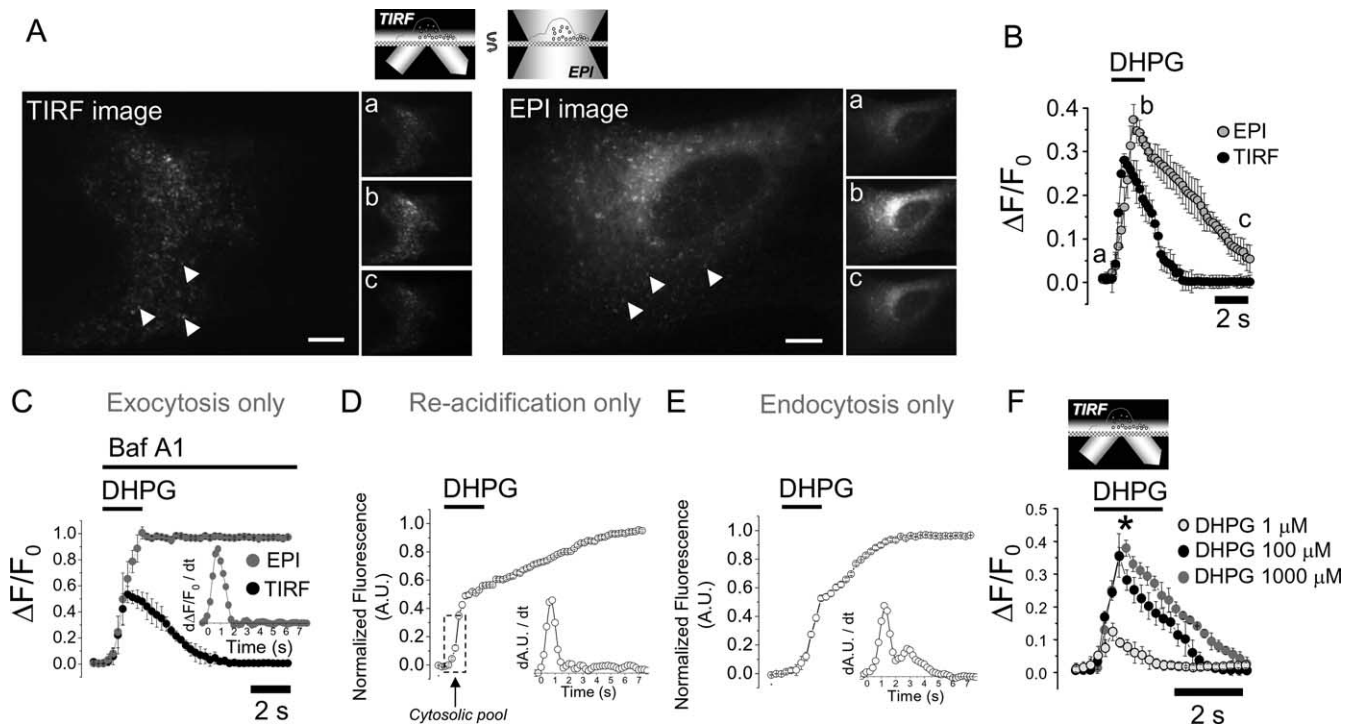


Figure 1. Characteristics of GPCR-evoked exo-endocytosis and reacidification of SLMVs in astrocytes: whole-cell studies. Experiments were performed under TIRFi and EPIi. **A**, The two large images represent the same astrocytes transfected with VGLUT1-pHluorin and illuminated with TIRFi or with EPIi. Arrows indicate fluorescent spots corresponding to SLMVs undergoing spontaneous exocytosis. The sequence of images (a, b, c) shows the whole-cell pHF signal before (a), during (b), and after (c) DHPG application under the two illuminations. Scale bars, 10 μm . **B**, Time course of the DHPG-induced pHF intensity change obtained with TIRFi and EPIi. The curves represent the whole-cell pHF signal, expressed as $\Delta F/F_0$, obtained averaging results from 27 cells. Note that both the rise and the decay times are both faster under TIRFi (rise time: $\tau_{\text{riseTIRFi}} = 0.3 \pm 0.088 \text{ s}$, $\tau_{\text{riseEPI}} = 0.85 \pm 0.18 \text{ s}$, $p < 0.05$, unpaired t test; decay time: $\tau_{\text{decayTIRFi}} = 1.63 \pm 0.10 \text{ s}$, $\tau_{\text{decayEPI}} = 5.4 \pm 0.58 \text{ s}$, $p < 0.05$, unpaired t test). Data points are collected every 200 ms and represent mean values \pm SD. **C**, Same as **B**, but in the presence of Baf A1 (5 μM ; $n = 20$ cells). The rate of spontaneous alkalinization (TIRFi, $0.038 \pm 0.005 \Delta F/F_0$; EPIi, $0.057 \pm 0.01 \Delta F/F_0$) was calculated in the prestimulus period and subtracted from the curves. Note that the curve under EPIi represents a cumulative curve of exocytosis; the curve under TIRFi is not significantly different from the one obtained in the absence of Baf A1 ($\tau_{\text{riseTIRFiBaf}} = 0.25 \pm 0.092 \text{ s}$ vs $\tau_{\text{riseTIRFi}} = 0.3 \pm 0.088 \text{ s}$; $\tau_{\text{decayTIRFiBaf}} = 1.59 \pm 0.09 \text{ s}$ vs $\tau_{\text{decayTIRFi}} = 1.63 \pm 0.1 \text{ s}$, $p < 0.05$, unpaired t test). In the inset, curves represent the first derivative ($d\Delta F/F_0/dt$) of the EPI curve and provide the temporal distribution of the exocytic events. **D**, Cumulative curve of estimated reacidification obtained by subtracting the normalized curves of the pHF signal obtained under EPIi in the absence of Baf A1 (curve in **B**) from the curve in the presence of the drug (curve in **C**). Curves in **B** and **C** were normalized to the maximum fluorescence obtained under EPIi in the presence of Baf A1 for each cell. In the inset, curves represent the first derivative ($dA.U./dt$) of the curve and provide the temporal distribution of the reacidification processes. Note that during the first 800 ms after the stimulus, the reacidification is detected only by EPIi and involved pool of vesicles located out of the EW field. **E**, Cumulative curve of estimated endocytosis (movement out of EW field) obtained by subtracting the normalized curves of the pHF signal obtained under TIRFi and under EPIi both in the presence of Baf A1 (curves in **C**). Curves in **C** were normalized to the maximum fluorescence obtained under EPIi and TIRFi, respectively, in the presence of Baf A1 for each cell. In the inset, curves represent the first derivative ($dA.U./dt$) of the curve and provide the temporal distribution of the endocytic events. **F**, Curves represent the pHF signal obtained under TIRFi in response to different DHPG concentrations expressed as $\Delta F/F_0$ (1, 100, 1000 μM each; $n = 10$ cells; 0.115 ± 0.025 , 0.357 ± 0.048 , $0.39 \pm 0.025 \Delta F/F_0$, respectively). The $\Delta F/F_0$ response and the rates of recovery to 100 μM DHPG is significantly different from the response to 1 μM DHPG but not from the response to 1000 μM DHPG (1, 100, 1000 μM : 0.06 ± 0.01 , 0.12 ± 0.05 , $0.1 \pm 0.04 \text{ A.U./s}$, respectively; * $p < 0.05$, one-way ANOVA). Note that 1 mM DHPG did not cause more fluorescence increase than 100 μM because the exocytosis is most probably saturated (supplemental Fig. 4 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

with the plasma membrane (Fig. 1Aa–c). By placing a ROI on the whole-cell perimeter, we measured the kinetics of the DHPG-evoked pHF signal at the whole-cell level. Figure 1B compares the kinetics of the total pHF signal induced by DHPG under TIRFi and EPIi. In both cases, the rising phase of the signal is faster than its decay phase. However, under TIRFi, rise and decay time are significantly faster than under EPIi. To interpret this observation one has to take into account that the curve of the DHPG-evoked pHF signal represents at all times the net balance of exocytosis and endocytosis/reacidification (Sankaranarayanan and Ryan, 2000; Atluri and Ryan, 2006; Voglmaier et al., 2006). The rising phase indicates prevalent exocytosis and the decaying phase prevalent endocytosis and reacidification (Sankaranarayanan and Ryan, 2000; Schweizer and Ryan, 2006). On this basis, one can hypothesize that (1) the rise time of the DHPG-evoked pHF signal under TIRFi is faster than under EPIi because EPIi monitors vesicle reacidification processes occurring in cytosolic layers not accessible to TIRFi [penetration of the evanescent field (EW) in our apparatus is $\sim 90 \text{ nm}$], and (2) the decay time under TIRFi is

faster than under EPIi because endocytosed vesicles move out of the EW field before undergoing reacidification. To test these hypotheses, we performed “alkaline trapping” experiments to fully separate the three processes and determine their respective kinetics by using the V-type ATPase inhibitor Baf A1 (Sankaranarayanan and Ryan, 2000). Taken up by SVs during exocytosis, Baf A1 blocks the proton pump and prevents reacidification, trapping VGLUT1-pHluorin-expressing vesicles in the fluorescent state. Addition of Baf A1 thereby eliminates all changes of the pHF signal attributable to the reacidification component of recycling to reveal pure exocytosis. Astrocytes were exposed to 5 μM Baf A1, a dose known to completely inhibit extinction of the pHF signal in synaptic terminals (Sankaranarayanan and Ryan, 2001). As shown in Figure 1C, in the presence of Baf A1, under EPIi, DHPG evoked a nondecaying pHF signal that reached plateau in $1.6 \pm 0.33 \text{ s}$. Given that its rising phase corresponds to pure exocytosis, the slope of the linear fit represents the rate of the exocytic process ($0.77 \pm 0.056 \text{ A.U./s}$). By calculating the first derivative of the curve, we found that exocytosis reaches maximal

speed at 800 ms (Fig. 1C, inset). This time represents the inflection point of the curve that indeed tends to have a flattened “S” shape, suggesting that exocytosis proceeds with an exponential time course for 800 ms and then gradually slows ($\tau_{\text{riseEPIBaf } 0-800 \text{ ms}} = 0.24 \pm 0.017 \text{ s}$). Interestingly, in the presence of Baf A1, the TIRFi curve shows a rise time almost identical to the one of EPIi and comparable with those of TIRFi curves obtained in the absence of Baf A1 ($\tau_{\text{riseTIRFBaf}} = 0.25 \pm 0.092 \text{ s}$ vs $\tau_{\text{riseTIRF}} = 0.3 \pm 0.088 \text{ s}$). These results confirm our hypothesis and indicates that (1) the difference between EPIi and TIRFi observed in the absence of the drug is attributable to reacidification occurring in the EPIi field but not in the TIRFi field and that (2) Baf A1 has no effect on both the rise and decay phases of the TIRFi ($\tau_{\text{decayTIRF Baf}} = 1.59 \pm 0.09 \text{ s}$ vs $\tau_{\text{decayTIRF}} = 1.63 \pm 0.1 \text{ s}$) curve because vesicles escape the EW field before reacidification. Moreover, the identical slope observed in TIRFi and EPIi curves in the first 800 ms indicates the absence of vesicle movement out of the EW field (endocytosis) in this initial period. All of the parameters we calculated are summarized in supplemental Table 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material.

We subsequently estimated reacidification (Fig. 1D; supplemental Fig. 2 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material) by subtracting the normalized EPIi curve in the absence of Baf A1 (Fig. 1B) from the one in the presence of the drug (Fig. 1C). During the stimulus, similarly to exocytosis, the reacidification proceeds with an exponential time course for 800 ms and then gradually slows (the curve shows a sigmoidal shape centered at 800 ms). The exponential fits allowed us to estimate the time constant of reacidification processes ($\tau_{\text{rise } 0-800 \text{ ms}} = 0.22 \pm 0.02 \text{ s}$) that, based on the previous results, are detected only by EPIi and involved pool of vesicles located deep in the cytoplasm and out of the EW field. The poststimulus reacidification instead displays a linear increase reaching a plateau in $\sim 10 \text{ s}$ ($0.052 \pm 0.0008 \text{ A.U./s}$). We finally estimated endocytosis (Fig. 1E; supplemental Fig. 2 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material) by subtracting the normalized TIRFi curve from the normalized EPIi curve, both obtained in the presence of Baf A1 (Fig. 1C). The endocytosis starts 600 ms after the stimulus, proceeds with an exponential time course for 400 \div 600 ms, then gradually decline ($\tau_{\text{rise } 800-1200 \text{ ms}} = 0.26 \pm 0.03 \text{ s}$). Interestingly, by calculating the first derivative (Fig. 1E, inset), we found that the endocytosis curve contains two inflection points at 1.2 s and at 2.8 s ($\tau_{\text{rise } 2000-2800 \text{ ms}} = 1 \pm 0.25 \text{ s}$), suggesting the presence of two distinct phases of endocytosis. The rates of endocytosis during and after the stimulus were estimated by linear fitting (0.8–2 s, $0.66 \pm 0.025 \text{ A.U./s}$; $>2 \text{ s}$, $0.16 \pm 0.005 \text{ A.U./s}$) (see Fig. 6).

In the subsequent set of experiments, we confirmed that exo-endocytosis is controlled by the intensity of G-protein-coupled receptor (GPCR) stimulation as the peak value of the pHF signal varied with the dose of agonist (Fig. 1F). Moreover, we found that the process requires release of Ca²⁺ from internal stores. Indeed, the DHPG-evoked pHF signal was abolished by inhibition of the ER Ca²⁺-ATPase by either thapsi [$-91.7 \pm 2.7\%$; 50 nM, 20 min; $n = 10$ cells, 5 experiments (exps)] or CPA ($-80.6 \pm 6.6\%$; 10 μM , 15 min; $n = 8$ cells, 4 exps).

Kinetic analysis at the single vesicle level

To study the kinetics of exo-endocytosis at the level of individual SLMVs, we performed experiments under TIRFi that, producing an EW, in our set-up excites fluorophores within 80–90 nm from the plasma membrane (Domercq et al., 2006). Astrocytes were transfected with two different constructs: VGLUT1 coupled to

mCherry (red, VGLUT1-mCherry), labeling the SLMV membrane, and VGLUT1-pHluorin (green), signaling exocytic fusion of the SLMV (Tsuboi and Rutter, 2003).

By using a dual wavelength TIRF (568/488 nm), we then monitored (at 20 Hz) individual double-fluorescent SLMVs and evaluated their emission intensities in both a small circle around the vesicle and a concentric annulus around the circle (Bezzi et al., 2004). Under basal conditions, the vast majority (97.4%) of the observed fusion events fell into two well-defined and distinct categories (subtype 1 and subtype 2 events). Subtype 1 events accounted for 63% of the events ($n = 26$ cells). They were characterized by the abrupt appearance in the EW field of the pHF signal that remained constant for 400 ms to then disappear without any significant lateral diffusion (Fig. 2A). VGLUT1-mCherry fluorescence (mCF), already present in the EW field at the appearance of the pHF signal, remained constant (approximately -0.01% of $\Delta F/F_0$) during the 400 ms of the fusion event, and then disappeared together with the pHF signal. We interpret the simultaneous disappearance of the two fluorescent markers as a movement of the SLMV out of the EW field. Moreover, the fact that, during the fusion event, both markers were retained in the vesicle membrane strongly suggests a “kiss-and-run” mode of exo-endocytosis (Fesce et al., 1994) (Fig. 2A, diagram). SLMVs (8.7%) showing a subtype 1 fusion displayed a much longer increase of fluorescence (up to 7.5 s) before returning to basal level.

In the case of a subtype 2 event, fusion lasted longer and proceeded differently. The pHF signal, once it appeared, started to diffuse in the external annulus and was diluted out in $\sim 700 \text{ ms}$; in parallel, the mCF signal progressively decreased in intensity ($-86 \pm 0.7\%$ of $\Delta F/F_0$ in 400 ms; $n = 475$; $p < 0.05$, unpaired t test) (Fig. 2B). These two combined events suggest that the SLMV loses its identity by mixing with the plasma membrane and undergoes a classical “full-collapse” type of fusion (Fig. 2B, diagram).

To confirm that increases in pHF signal depended on exocytic fusion of SLMVs with the plasma membrane, we performed a parallel set of experiments using VGLUT1-pHluorin-transfected astrocytes bathed in external medium containing FM 4–64, an amphipathic dye that loads into vesicles only when they fuse with the plasma membrane (Gaffield and Betz, 2006). Indeed, in all of the cases when a pHF signal appeared, the FM dye immediately started to accumulate in the SLMV membrane (Fig. 2A, B, bottom). Its fluorescence remained visible throughout the duration of the pHF signal and eventually disappeared with it, indicating that FM 4–64 was taken up by the fused vesicle and followed its fate.

Subsequently, we studied the time distribution of the individual fusion events evoked by GPCR stimulation in the doubly transfected cells. Figure 2C shows that application of DHPG triggered a burst of exocytosis comprising two phases: a rapid one, peaking at 200–300 ms, and a slower one, peaking at 400–600 ms. We used the mCF signal to subdivide SLMVs into “residents” (vesicles present in the EW field before the stimulus) and “newcomers” (vesicles whose mCF signal appeared in the EW after the stimulus) (Zenisek et al., 2000). We found that SLMVs undergoing exocytosis during the rapid phase (0–400 ms) were mostly residents (83%, corresponding to 42% of the total number of DHPG-evoked fusion events; $n = 8400$), whereas vesicles undergoing exocytosis during the slow phase (500 ms–1.6 s) were almost all newcomers (88%), possibly representing recycling vesicles (Fig. 2D). Interestingly, the majority of resident SLMVs that fused underwent subtype 1 (92.5%), whereas the majority of newcomer SLMVs that fused underwent subtype 2 (84.6%).

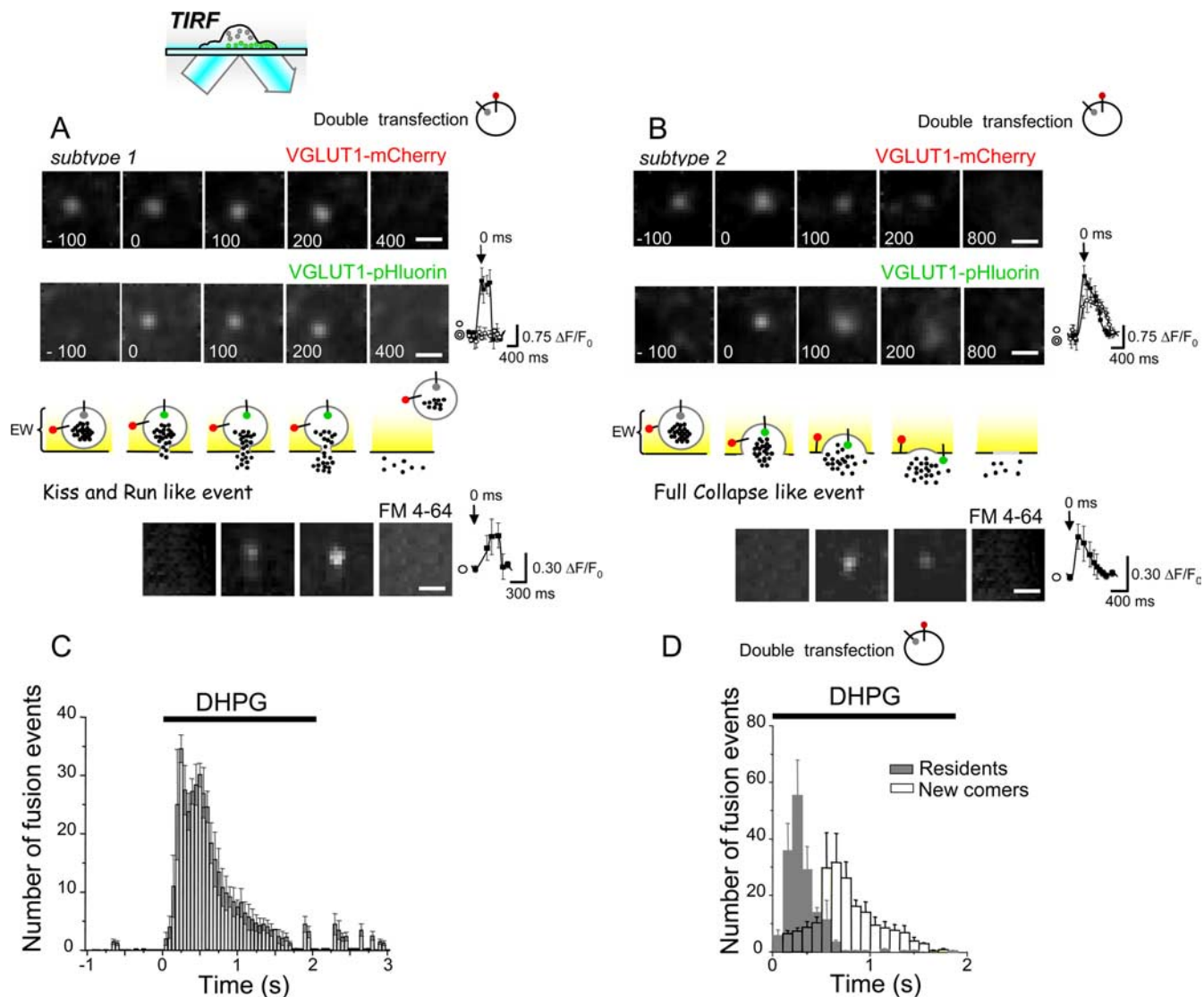


Figure 2. Evidence for two modes of exo-endocytosis: single vesicle studies. Experiments were performed under TIRFi. **A**, Images and schematic diagram illustrate a typical subtype 1 fusion event. The first two sequences of images from top to bottom represent the dynamics of mCF and pHF signals taken in parallel from the same SLMV undergoing a fusion event. Top right, Time course of pHF changes (average of 112 different SLMVs, $n = 26$ cells) in a small circle enclosing the fluorescent spot (filled circles) and in a concentric annulus around the circle (open circles). The scheme below summarizes the behavior of the two fluorescent markers during a subtype 1 fusion that is consistent with the kiss-and-run type of fusion. The color code for the pHF signal is gray when the signal is off and green when it is on. The last sequence of images at the bottom shows the time course of FM 4–64 loading during a subtype 1 fusion event. Images are temporally aligned with the pHF sequence. Bottom right, Time course of FM 4–64 fluorescence changes (average of 140 different SLMVs, $n = 12$ cells) measured in a small circle enclosing the fluorescent spot (filled circles). Scale bars, $0.5 \mu\text{m}$. **B**, Images and schematic diagram illustrate a typical subtype 2 fusion event. The figure is organized as in **A**, but notice the different timing of the images, the different time courses of pHF and FM 4–64 signals, and the different behavior of the two fluorescent markers in the scheme representing a subtype 2 fusion. Such fusion is consistent with the full collapse type of fusion. **C**, **D**, Temporal distribution of fusion events evoked by DHPG application (2 s, $100 \mu\text{M}$). **C**, Each individual histogram represents the number (mean \pm SD) of fusion events detected in a 50-ms-long frame ($n = 34$ cells). **D**, Temporal distribution of fusion events for resident vesicles (gray) and for newcomer vesicles (white). White frames overlapped with gray histograms highlight newcomer fusion events at times when resident fusion events prevail. Each histogram represents the number (mean \pm SD) of fusion events counted in a 100-ms-long frame ($n = 20$ cells).

Spatial relationship between ER and SLMVs

The spatial-temporal characteristics of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals triggering exocytosis in astrocytes have not yet been investigated. According to previous study, somatic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevations in response to GPCR activation peak within 1–2.5 s from stimulation (Fiacco and McCarthy, 2006). Therefore, these signals are too slow to underlie the exo-endocytosis processes reported here. Considering that SLMV exocytosis takes place on a millisecond time-scale and depends on Ca^{2+} release from internal stores, one would predict the existence of localized ER-dependent $[\text{Ca}^{2+}]_i$ events near the fusion sites. As a consequence, we predicted that ER tubuli lie close to SLMVs and in proximity of the cell plasma membrane. To directly verify this possibility, we labeled the ER

tubuli by transfecting astrocytes with ER-GFP, a construct that targets GFP expression to the ER (Demaurex and Frieden, 2003). Figure 3A shows that the ER in astrocytes is a continuous network of tubuli and cisternae. Under TIRFi, the fluorescent structures appear discrete, consisting of tubular tips approaching the plasma membrane (Fig. 3B). Cotransfection of ER-GFP and VGLUT1-mCherry revealed an extensive overlay of ER and SLMVs, demonstrated by the close proximity of most of the red dots ($\sim 87\%$) to the green ER structures (Fig. 3B). By means of a cross-correlation analysis performed at the all-cell level, we found that ER and SLMVs are spatially correlated (supplemental Fig. 8 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). For a detailed analysis, we then focused on red dots corresponding to

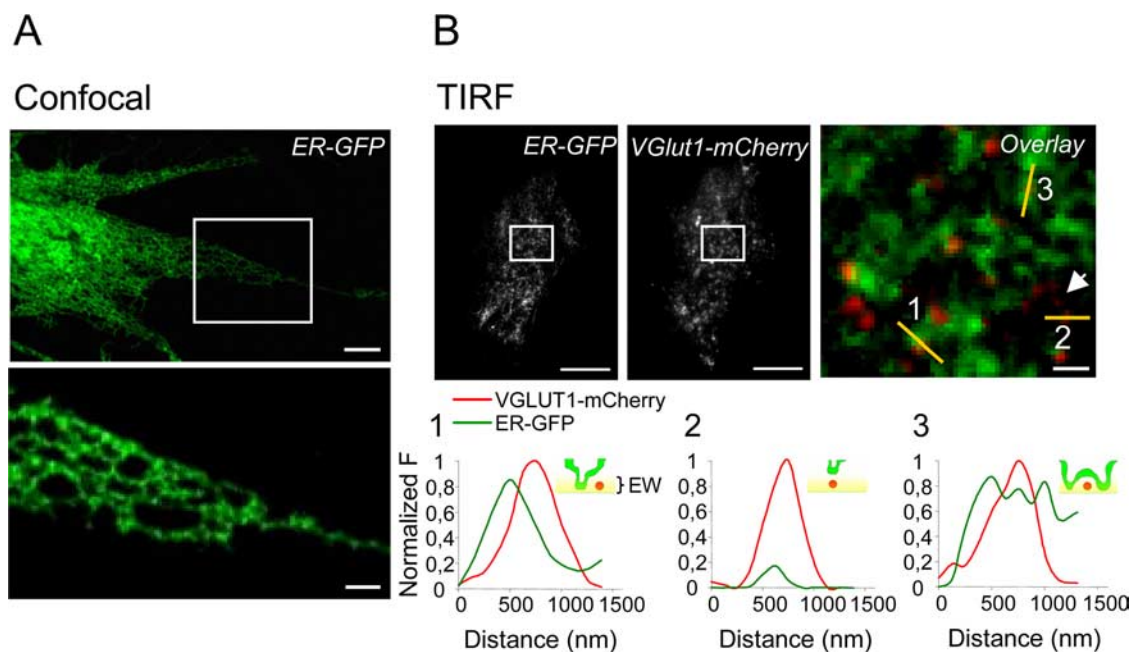


Figure 3. Spatial relationship between ER tubuli and SLMVs in the submembrane compartment. **A**, Confocal image of an astrocyte expressing ER-EGFP. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. The magnification of the boxed region (bottom) shows the distribution of ER tubuli in a fine process. Scale bar, $2 \mu\text{m}$. **B**, Top, TIRF images of an astrocyte expressing ER-EGFP and VGLUT1-mCherry. Scale bars, $10 \mu\text{m}$. The high magnification of the boxed region (top right) represents the overlay of the two images. Scale bar, $1 \mu\text{m}$. The discrete structures in green represent extremities of the ER tubuli approaching the plasma membrane (average, $248625 \pm 47201 \text{ nm}^2/\text{structure}$; $n = 283$ structures analyzed). The red dots are SLMVs resident in the EW field. ER tubules surround almost all of the vesicles in the field; only one vesicle (arrow) has no ER tubules within $1.5 \mu\text{m}$. Bottom, Curves represent line intensity profiles calculated across green structures and red puncta in three representative cases corresponding to the numbered yellow lines in the overlay image. Diagrams in the insets illustrate the spatial distribution of ER tubules (green) and SLMVs (red) in the EW field for each representative case.

individual SLMVs (supplemental Fig. 6 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). A line of fluorescence intensity profile was traced across any given red dot and its closest green structure to analyze their fluorescence distribution and to extrapolate the interdistance between ER and SLMV (supplemental Fig. 7 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material, and image analysis SI, available at www.jneurosci.org). The most frequent result ($47 \pm 7.5\%$ of cases; $n = 6$ cells) was an SLMV and ER tubuli located side by side (Fig. 3B, case 1). Their fluorescence curves typically overlapped, indicating that ER and SLMV were located within a distance smaller than the point spread function of our microscope. Their average interdistance interval was $375 \pm 185 \text{ nm}$. Another frequent situation ($31.4 \pm 5.9\%$ of cases) was the alignment of SLMV and ER on the z -axis, as shown by the complete overlap of the two intensity profiles despite a difference in intensity between corresponding peaks (Fig. 3B, case 2). In a small number of cases ($8.4 \pm 7.4\%$), the ER-GFP profile had a “donut-shaped” distribution with a central dimple occupied by the VGLUT1-mCherry-expressing vesicle (Fig. 3B, case 3). Taking into account that our study was performed in the limited submembrane field illuminated by TIRF, we conclude that ER tubuli and SLMVs, together with the plasma membrane, delimit submicrometer cytosolic compartments.

Subplasma membrane Ca^{2+} events

Given the presence of ER tubuli together with SLMVs just beneath the plasma membrane, we subsequently used TIRFi imaging (488 nm , 20 Hz) to selectively investigate submembrane Ca^{2+} signals occurring in the EW field (Steyer and Almers, 2001). Experiments were performed on nontransfected astrocytes loaded with a green $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indicator, Fluo4-AM, and Ca^{2+} signals studied both under basal conditions and upon GPCR stimulation

with DHPG. For analysis, we divided the cell profile appearing under TIRFi in small equal-sized ($4 \mu\text{m}^2$) squared regions, each of which could contain one SLMV and its surrounding ER structure (supplemental Fig. 9A SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). At first, we compared the average submembrane fluorescence signal (F) in 1 s periods taken before, during, and after stimulation with DHPG. F corresponds to the mean fluorescence value given by the sum of the signals from individual regions divided by the number of regions. In the presence of DHPG, F was significantly higher than in the periods immediately preceding and after the stimulation, indicating that mGluR stimulation triggers elevation of submembrane Ca^{2+} (supplemental Fig. 9B SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material) (DHPG, $234.32 \pm 2.92 F$; before, $203.02 \pm 0.86 F$; after, $218.33 \pm 0.82 F$; $n = 1275$ traces in 15 cells; $p < 0.05$, multiple-comparison ANOVA). We then proceeded to define the spatial-temporal characteristics of individual submembrane Ca^{2+} events. By means of a retrospective analysis, we centered the ROIs on each visualized Ca^{2+} signal and analyzed the fluorescence traces. The submembrane Ca^{2+} signals have been expressed as $\Delta F (F - F_0)$ divided by F_0 , in which the F_0 is the mean of $\sim 1 \text{ s}$ of the basal level in each respective ROI before the stimulus (supplemental Fig. 10 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material; Image analysis SI, available at www.jneurosci.org). As shown in Figure 4A, very rapid, spike-like Ca^{2+} events were easily distinguishable. By acquiring images at 40 Hz , we highlighted the morphology of such spiking Ca^{2+} events and established that most of them last $\sim 150 \text{ ms}$ and peak at 50 ms ($n = 583$ traces from five cells) (Fig. 4A, insert). Under basal conditions, the frequency of the rapid submembrane Ca^{2+} events was very low ($0.87 \pm 0.34/\text{s}/\text{ROI}$; $n = 1005$ events in 25 cells). Application of DHPG induced within 300 ms an ~ 4 -fold

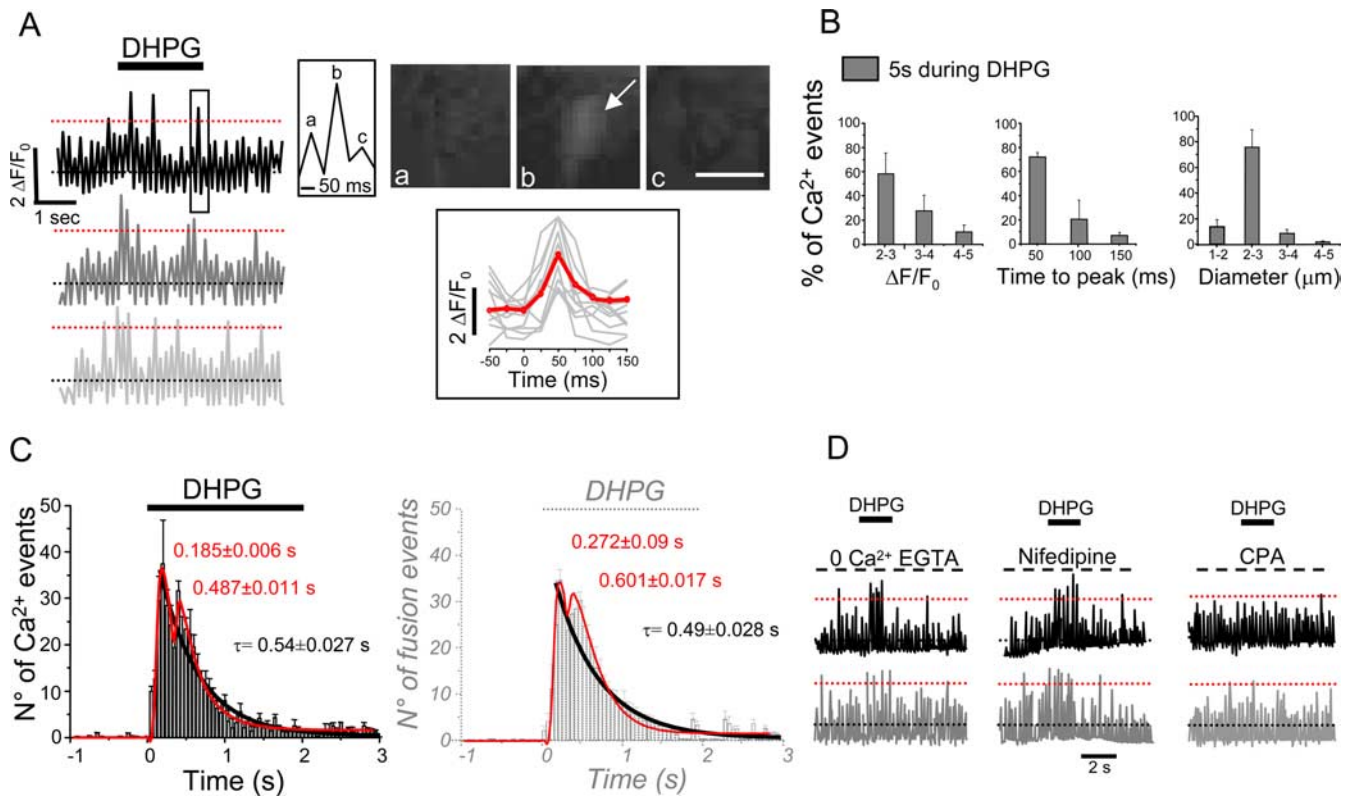


Figure 4. GPCR-evoked submembrane Ca^{2+} events. Experiments performed under TIRFi. **A**, Right, top to bottom, Three representative traces of submembrane Ca^{2+} changes, each one showing periods before, during, and after application of DHPG ($100 \mu\text{M}$, 2 s). The black dotted lines in the traces indicate the average basal fluorescence value; the red dotted lines indicate the fluorescence value exceeding the basal value by twofold. On the right of the traces, the high magnification of the boxed region shows a typical fast submembrane Ca^{2+} event. Farther on the right are presented the TIRF images (filtered with low pass filter) corresponding to that Ca^{2+} event (a–c). Scale bar, $2 \mu\text{m}$. In the inset below the images, traces represent an expanded view of temporally aligned Ca^{2+} events (gray) and of their average (red) obtained from 467 ROIs ($n = 3$ cells) located in different cellular regions. Data points were collected every 25 ms (sampling rate, 40 Hz). **B**, Frequency histograms providing information on the features of submembrane Ca^{2+} events in terms of amplitude ($\Delta F/F_0$), time-to-peak (milliseconds), and diameter of spread in the x - y plane (μm) during 5 s of DHPG. Data obtained from 6706 Ca^{2+} events ($n = 12$ cells) were put into bins and their frequency expressed as percentage of the total number of events. **C**, Temporal distribution of the Ca^{2+} events (left) compared with the distribution of the fusion events (ghost on the right). Each histogram represents the number (mean \pm SD) of events counted in a 50-ms-long frame ($n = 25$ cells). Red lines represent double exponential fits (peak times are written in red on top of each peak), and black lines represent single exponential decay (τ_{decays} are written on the side in black). **D**, Representative Ca^{2+} traces of an experiment as in **A**, but in which cells were exposed to an external medium either lacking Ca^{2+} (0 Ca^{2+} with 5 mM of EGTA; $n = 8$ cells), or containing nifedipine ($3 \mu\text{M}$; $n = 10$ cells), or CPA ($10 \mu\text{M}$, 15 min; $n = 7$ cells).

increase of their mean frequency ($3.45 \pm 1.13/\text{s}/\text{ROI}$; $n = 6706$ events in 25 cells; $p < 0.05$, unpaired t test). It also increased their mean amplitude by ~ 1.7 -fold (1.62 ± 0.72 basal vs 2.8 ± 0.7 stimulated $\Delta F/F_0$; $n = 6706$ events in 25 cells; $p < 0.05$, unpaired t test) but did not modify their temporal profile. In parallel, we evaluated the propagation of the spiking Ca^{2+} signals in the x - y plane by following the lateral spread of fluorescence in three concentric ROIs (diameter: 2, 4, and $6 \mu\text{m}$, respectively) centered on each Ca^{2+} signal. The diameter of most of the Ca^{2+} events was $\leq 3 \mu\text{m}$. The average diameter ($1.75 \pm 0.18 \mu\text{m}$) was increased by DHPG application ($2.5 \pm 0.34 \mu\text{m}$; $p < 0.05$, unpaired t test). Interestingly, we noticed that DHPG induced a small fraction ($\sim 7.5\%$) of the Ca^{2+} events to propagate at long distance (up to $14 \mu\text{m}$) from the ROI in which they originate, causing a submembrane Ca^{2+} wave (data not shown). Our results indicate that submembrane Ca^{2+} events are generally short lived and spatially confined. Their specific characteristics in terms of amplitude ($\Delta F/F_0$ maximum), kinetics, and lateral propagation are summarized in Figure 4B. The temporal distribution of the submembrane Ca^{2+} events evoked by DHPG application is shown in Figure 4C. Such a distribution corresponds to a biphasic burst in all similar to the one observed for the exocytic events (Figs. 2C; 4C, ghost). Indeed, DHPG-evoked Ca^{2+} and exocytic events were found to be strictly temporally correlated; in particular, each

one of the two peaks of Ca^{2+} events preceded the corresponding peak of exocytic events by an interval of ~ 100 ms.

Finally, with pharmacological experiments shown in Figure 4D, we confirmed that submembrane Ca^{2+} events depend exclusively on Ca^{2+} released from internal stores. Thus, the number of events remained unchanged when we removed Ca^{2+} from the incubation medium (0 Ca^{2+} with 5 mM EGTA) or added nifedipine ($3 \mu\text{M}$), a blocker of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels. In contrast, the number of events increased during the first 15 s of incubation with CPA (approximately by 3.8-fold) (supplemental Fig. 11 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and returned to a baseline value between 1 and 7 min ($0.76 \pm 0.25/\text{s}/\text{ROI}$) and eventually almost completely disappeared in ~ 10 min ($0.095 \pm 0.014/\text{s}/\text{ROI}$). After 15 min of incubation with CPA, application of DHPG failed to induce submembrane Ca^{2+} events (Fig. 4D). These results constitute the first evidence of spatially confined, ER-mediated submembrane Ca^{2+} events occurring in astrocytes on a millisecond time scale.

Spatial and temporal correlation between submembrane Ca^{2+} events and SLMV exocytic events

To directly prove that fast submembrane Ca^{2+} elevations are the events triggering exocytosis of SLMVs, we monitored the two types of event simultaneously and defined their spatial and tem-

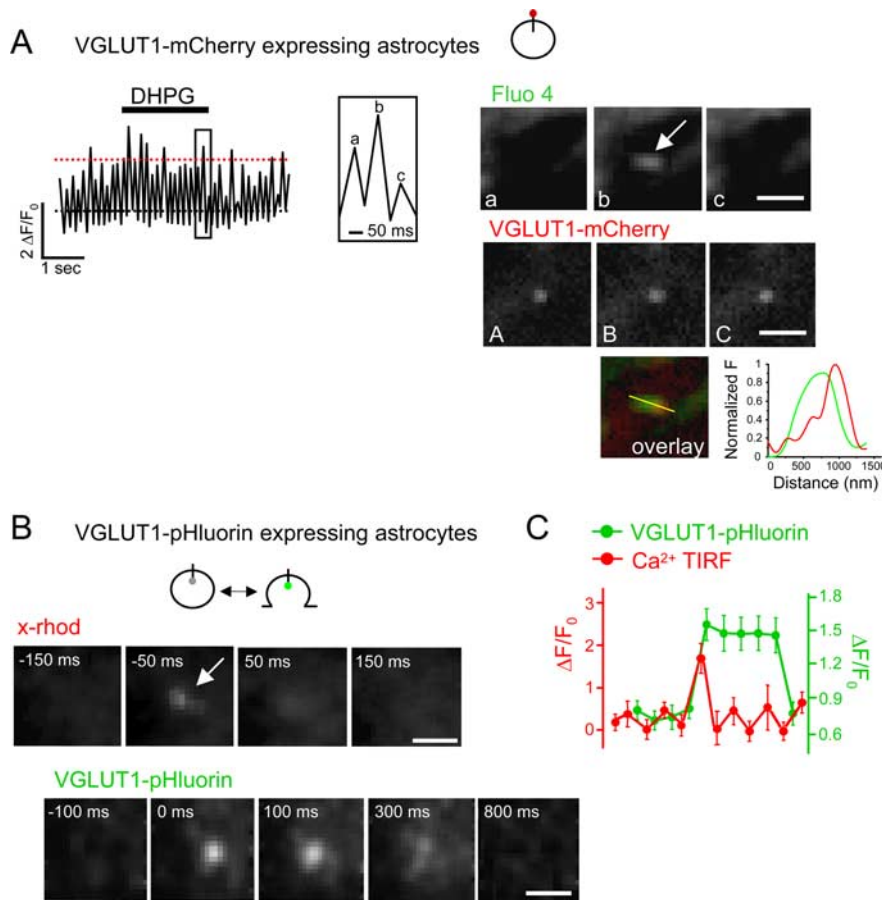


Figure 5. Spatial-temporal correlation of submembrane Ca²⁺ events and SLMV fusion events. **A**, Spatial correlation of Ca²⁺ events and SLMV fusion events. Left, Representative trace of fast submembrane Ca²⁺ events occurring in a ROI centered on an SLMV expressing VGLUT1-mCherry. The high magnification (right) shows the kinetics of the Ca²⁺ event in the boxed region. Right, top to bottom, Sequence of TIRF images of the same Ca²⁺ event (a–c), corresponding sequence of the SLMV (A–C), and colored overlay showing colocalization of the Ca²⁺ event with the vesicle. The diagram on the side of the overlay illustrates the spatial distribution of the Ca²⁺ event (green) and of the SLMV (red) in the EW field. Scale bars, 2 μm. **B**, **C**, Temporal correlation of Ca²⁺ events and SLMV fusion events. **B**, Representative sequences of TIRF images monitoring a Ca²⁺ event (top) and a subtype 2 fusion event of a VGLUT1-pHluorin-expressing SLMV (bottom) occurring in the same ROI. Ca²⁺ events are monitored as changes in fluorescence of the red dye, x-rhod. Note that the Ca²⁺ event precedes vesicle fusion by one frame (–50 ms). Scale bars, 1 μm. **C**, Correlated time course of Ca²⁺ events and SLMV fusion events. Data points (mean ± SD) were collected every 50 ms. The red curve represents the average kinetics of the Ca²⁺ event calculated by a pool of 35 Ca²⁺ events (*n* = 10 cells). The black curve represents the average kinetics of the fusion event occurring in temporal correlation with the Ca²⁺ event in the same ROIs. The two curves were normalized and aligned: as a result, the peak of the Ca²⁺ event precedes by 50 ms the peak of the SLMV fusion event.

poral correlation. First, we focused on the spatial aspect. Astrocytes were transfected with VGLUT1-mCherry, loaded with Fluo4-AM, and imaged under dual wavelength TIRFi (488/568 nm, 40 Hz). To monitor Ca²⁺ events at the maximal possible speed, we restricted sampling to 10 ROIs randomly selected at different cell locations, in both the cell body and the processes. ROIs (6 μm²) were centered on an individual SLMV, identified by its mCF signal (supplemental Fig. 1 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). When we stimulated with DHPG, spike-like submembrane Ca²⁺ events (1.6 ± 0.5/s/ROI; *n* = 250 ROI in 25 cells) identical to those observed previously in nontransfected cells appeared in the ROIs (average time to peak, 58.6 ± 8.2 ms; diameter, 2.1 ± 1.6 μm; *n* = 1340 traces from 10 cells) (Fig. 5A). Interestingly, by means of cross-correlation analysis, we found that the submembrane Ca²⁺ events, similarly to the ER structures, occurs in strict spatial correlation with submembrane sites SLMVs (those most probably

representing the ready to fuse vesicles) (supplemental Fig. 8 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). For detailed analysis, we then traced a line of fluorescence intensity profile over the mCF signal and the closest Fluo4 fluorescence signal. Practically, in all cases that we analyzed (96.4 ± 2.4%; *n* = 250 pairs in 25 cells) (Fig. 5A), the two curves overlapped for >75% and their peaks had an average interdistance of 245 ± 8.3 nm. Interestingly, in some cases (12.6% of pairs), the [Ca²⁺]_i event showed a “donut-shape distribution” (reminiscent of the ER distribution around SLMV) in which the fluorescence intensity profiles of the mCF were bell shaped, whereas those of Fluo-4 showed humps on both sides of the SLMV profile, suggesting that [Ca²⁺]_i rises to highest levels around the vesicular organelle.

Subsequently, we considered the temporal aspect. Individual Ca²⁺ events and single SLMV fusions were monitored in parallel, the latter revealed by VGLUT1-pHluorin, the former by the red calcium indicator x-rhod-1-AM (488/568 nm, 20 Hz). To compensate for the fact that x-rhod gives a smaller ΔF than Fluo4 for the same Δ[Ca²⁺], we restricted our analysis to ROIs selected in the cell regions with highest signal-to-noise ratio (i.e., the cell processes and the border of the cell body). In 28 cells stimulated with DHPG, we most often observed (65% of 225 cases) a Ca²⁺ event rapidly followed (≤3 frames) by a fusion event (Fig. 5B). In only 20% of cases, the Ca²⁺ event was not followed by a detectable fusion event in the same ROI, and in 15% of cases, the fusion event was not preceded by a Ca²⁺ event. The averaged kinetics of Ca²⁺ and fusion events in Figure 5C show a strict temporal correlation, with the Ca²⁺ peak preceding the pHF peak by 57.9 ± 4.5 ms (*n* = 35 from 10 cells). Importantly, when we depleted

the ER Ca²⁺ stores with CPA, we observed a dramatic reduction of both submembrane Ca²⁺ events and SLMV fusion events (–85 ± 14% and –89 ± 12%, respectively; *n* = 102 ROIs in 12 cells), implying that the two types of event are causally related. Overall, our observations indicate that exocytosis of SLMVs in response to GPCR stimulation is sustained by fast, local Ca²⁺ elevations mediated by Ca²⁺ release from the ER and suggest for the first time that the stimulus-secretion coupling in astrocytes occurs at the level of functional microdomains.

Discussion

Characteristics of SLMV exocytosis and endocytosis in astrocytes

Although it is increasingly clear that astrocytes express multiple populations of secretory organelles, imaging studies performed to date used generic fluorescent markers of exocytosis that do not distinguish among populations. The simultaneous recording of

fusion signals from distinct populations of secretory organelles may lead to significant discrepancies in the kinetic values of exocytosis (Bezzi et al., 2004; Chen et al., 2005; Bowser and Khakh, 2007; Jaiswal et al., 2007). In the present study, we took advantage of VGLUT1-pHluorin to overcome limitations of previous works. Indeed, the intracellular distribution of VGLUT1-pHluorin showed that the vast majority of the GFP-labeled vesicles were positive for a SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) protein cellubrevin (Bezzi et al., 2004; Crippa et al., 2006), displayed a diameter compatible with SLMVs in other secretory cells and release glutamate (supplemental Figs. 1 SI, 2 SI, 3 SI, 5 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). We performed several sets of experiments to investigate spatial and temporal relations between $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and exocytosis processes in astrocytes.

At first, we defined the kinetics of exocytosis, endocytosis, and reacidification at the whole-cell level (Fig. 1). A major challenge consisted in separating the exocytosis and the two components of the endocytic process: the movement of the recently fused vesicles from plasma membrane to cytoplasm (out of the EW field) and the reacidification process. This was achieved with alkaline trapping experiments in that we isolated the exocytosis signal by blocking reacidification with the proton pump inhibitor Baf A1 (Sankaranarayanan and Ryan, 2001). In the presence of Baf A1, the rising phase under EPIi represented a pure measure of exocytosis (Fig. 1C). Comparison with the EPIi signal in the absence of Baf A1 enabled us to calculate the cumulative amount of reacidification by calculating the difference between the two (Fig. 1D); the resulting “difference curve” provided the complete kinetic of reacidification during and after the stimulus. Interestingly, in the first 800 ms, we calculated a fast rate of reacidification ($\tau = 0.22 \pm 0.02$) (Fig. 1D) that occurs in pool of vesicles located out of the EW field. The fast reacidification proceeds with a time course similar to exocytosis and most likely represents a mechanism responsible for uptake glutamate into the cytosolic pool of SLMVs.

By comparing the normalized EPIi and TIRFi curves in the presence of Baf A1, we then calculated the kinetic of the movement of SLMVs out of EW field (the first step of the endocytosis) (Fig. 1E). The first derivative of the endocytosis curve shows the evolution of the speed of endocytic events (Fig. 1E, inset); they start at ~ 600 ms, reach two maxima at 1.2 s, and at 2.8 s to then end after ~ 6 s. The bimodal distribution indicates the existence of two distinct phases of endocytosis. By directly comparing the kinetics of endocytosis and exocytosis (Fig. 6), we found that during the stimulus, the rate of endocytosis was more than half that of exocytosis (Endo/Exo, 0.85), indicating that SLMV retrieval proceeds fast enough to compensate for exocytosis (Fernández-Alfonso and Ryan, 2004).

In the second set of experiments we performed the analysis at the single vesicle level with TIRFi (Fig. 2). The fast imaging protocol applied in these sets of experiments provided new informations on the kinetic and modalities of exocytosis and recycling.

We found that the exocytic burst, similar to endocytosis, displayed a bimodal distribution (Fig. 2C), strongly suggesting the existence of two modes of exo-endocytosis. We confirmed this hypothesis with a double transfection approach in that we could directly visualize the fate of SLMVs during exocytosis and retrieval (Fig. 2A, B, D). Indeed, we noticed heterogeneity both in the origin of the SLMVs that underwent exocytosis (Fig. 2D, residents vs newcomers) and in their mode of fusion (kiss-and-run vs full-collapse type of fusion). The rapid phase of the exocytic burst (0–400 ms) was sustained almost exclusively by resi-

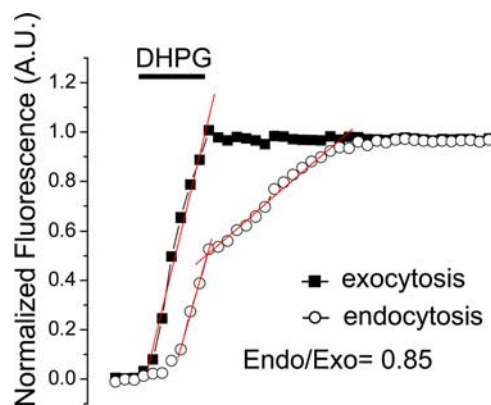


Figure 6. Rate of SLMV exocytosis and endocytosis in astrocytes. Curves representing kinetics of exocytosis (same as in Fig. 1C but normalized to the maximal fluorescence value in the presence of Baf A1, filled squares) and of endocytosis (same as in Fig. 1D, open circles) were temporally aligned with respect to the start of the stimulus. Red lines represent linear fits to the rising phases of the two curves. The ratio of the slopes of endocytosis and exocytosis (based on linear fits to the rising phases) provides an estimate of the speed of endocytosis relative to that of exocytosis during the stimulus ($\text{Endo}_{\text{speed}} = 0.85 \text{ Exo}_{\text{speed}}$).

dent vesicles undergoing kiss-and-run fusion, whereas the slow phase (500 ms–1.6 s) mainly by newcomer vesicles undergoing full-collapse fusion. This duality is reminiscent of observations in neurons in that only readily releasable SVs are rapidly recycled and reused (Harata et al., 2006). Our experiments do not clarify whether newcomers and resident vesicles represent distinct population of SLMVs. The newcomers may indeed represent the same population of resident vesicles that undergo a second round of exocytosis upon rapid recycling. In previous studies in which we used acridine orange (AO) as a fluorescent reporter of fusion events, DHPG stimulation induced a single monophasic burst of exocytosis, much shorter (~ 500 ms) than the one observed here (Bezzi et al., 2004; Domercq et al., 2006). In light of the present observations, it is possible that the release of AO in the external medium upon vesicle fusion prevented us from detecting exocytic events of recycled vesicles.

What can be the functional significance of the two modalities of secretion detected in astrocytes?

Studies in synaptic terminals indicate that full-collapse fusion (Heuser and Reese, 1973) and kiss-and-run (Fesce et al., 1994) coexist and play active roles in exocytic events. In particular, in small nerve terminals, kiss-and-run has an additional role of enabling nerve terminals to respond to high-frequency inputs with a scarce number of vesicles. In astrocytes, it is possible that, such as at nerve terminals, the two modalities of fusion can each contribute to maintain cellular communication over a wide range of different stimuli. Further studies are necessary to address this point.

Subplasma membrane Ca^{2+} microdomains regulate SLMV exocytosis in astrocytes

The present study addresses for the first time whether localized microdomains of Ca^{2+} control fusion events in astrocytes. Previous studies that monitored Ca^{2+} responses to GPCR activation focused on bulk $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes, in general limiting their observations to the somatic cell region (Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Pasti et al., 2001; Fiacco and McCarthy, 2006). Such Ca^{2+} elevations normally peaked within 1–2 s from stimulation and thus are too slow to underlie the rapid burst of exocytosis described here.

Here, by using TIRFi, we observed that localized domains of

Ca²⁺ exist at or near the sites of exocytosis. ER tubules and cisterns come in tight apposition of the plasma membrane, with a complex spatial arrangement that delimits tiny structural domains of submicrometer space (femtoliter). Such a spatial organization most likely limits diffusion of signaling molecules, including Ca²⁺. Moreover, ER structures and SLMVs lie in the submembrane compartments in tight spatial proximity, with an average distance of 300–500 nm. These results are in line with recent observations in that ER tubules have been considered to be distinct compartments, structurally and functionally coupled to the plasma membrane via cytoskeletal scaffold proteins (Tse et al., 1997; Blaustein and Golovina, 2001; Sala et al., 2005; Wu et al., 2006). In this respect, the organization of cytoskeleton in astrocytes could be similar to those at glutamatergic synapses, in which the scaffold protein Homer provides a molecular link between IP₃ receptors at the tip of the ER cisternae and mGluRs on the plasma membrane (Tu et al., 1998; Xiao et al., 1998; Sala et al., 2005).

What is the functional implication of the subplasma membrane ER domains? We found that stimulation of group I mGluRs generates store-dependent submicrometer Ca²⁺ events characterized by fast kinetics (50–150 ms) and spatial segregation ($\leq 3 \mu\text{m}$).

Importantly, in most cases Ca²⁺ events occurred at or near sites in which SLMVs underwent exocytosis ($\leq 280 \text{ nm}$) and were in strict temporal and spatial correlation with fusion events (supplemental Fig. 8 SI, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Indeed, Ca²⁺ and exocytosis displayed similar, biphasic distribution, with the Ca²⁺ peaks preceding the corresponding exocytosis peaks of $\sim 100 \text{ ms}$.

The typology of the subplasma membrane Ca²⁺ events observed in astrocytes is strongly reminiscent of the so-called “Ca²⁺ puffs” (Thomas et al., 2000; Bootman et al., 2001) that typically consist of a fast elevation of the [Ca²⁺]_i and limited spatial spread (Rizzuto and Pozzan, 2006). As for the astrocytic signals, we do not know whether their spatial characteristics reflect the clustering of IP₃Rs along the ER structures or the clustering of receptors along the plasma membrane, or both. The cumulative recruitment of Ca²⁺ puffs can lead to the initiation and propagation of a global cytosolic Ca²⁺ signal (Tovey et al., 2001). This may also occur in astrocytes; in limited cases, we observed long-distance (several μm) propagation of the Ca²⁺ events from the site of origin along the subplasma membrane, in the form of a submembrane Ca²⁺ wave. Moreover, in view of the limited depth of the TIRFi field, we cannot exclude that Ca²⁺ events propagate also in the z-axis.

How do subplasma membrane Ca²⁺ events control SLMV exo-endocytosis in astrocytes? In resting conditions, Ca²⁺ events display spontaneous oscillatory patterns that upon stimulation with DHPG increase in both the amplitude and the frequency (~ 2 - and 4-fold). However, at present, we cannot say whether one of the two plays a predominant role in triggering exocytosis.

Are these findings relevant to understanding the functional role of transmitter release from astrocytes in brain function? A few studies performed *in vivo* to date demonstrate that astrocytes respond to neuronal activity with slow and long-lasting [Ca²⁺]_i elevations, peaking within seconds from neuronal stimulation (Hirase et al., 2004; Nimmerjahn et al., 2004; Wang et al., 2006). A recent study, however, shows for the first time the occurrence *in vivo* of fast astrocytic Ca²⁺ events in response to neuronal activity, peaking in the millisecond time scale from sensory stimulation (Winship et al., 2007). This finding suggests that the fast Ca²⁺ events here identified are not a peculiarity of astrocytes in cell culture but may correspond to events taking place in astro-

cytes of the living brain. Establishing whether fast Ca²⁺ events *in vivo* are associated to transmitter release via SLMV exocytosis becomes, therefore, of the utmost importance to define the type of modulatory influence exerted by astrocytes on neighboring neuronal circuits.

References

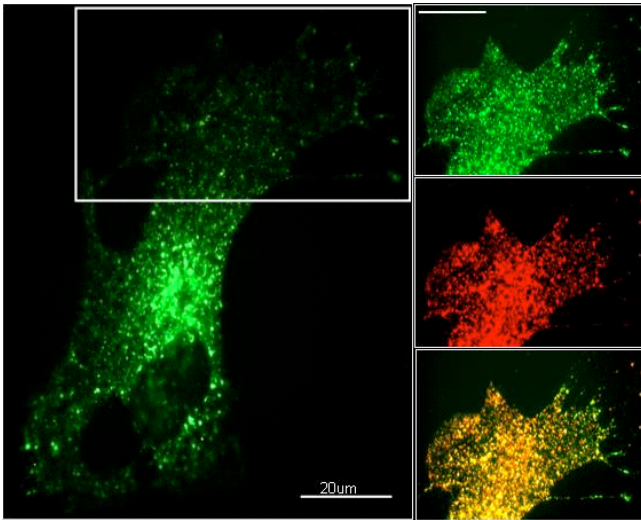
- Atluri PP, Ryan TA (2006) The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals. *J Neurosci* 26:2313–2320.
- Balaji J, Ryan TA (2007) Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20576–20581.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281–285.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702–710.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613–620.
- Blaustein MP, Golovina VA (2001) Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores. *Trends Neurosci* 24:602–608.
- Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ (2001) The organisation and functions of local Ca²⁺ signals. *J Cell Sci* 114:2213–2222.
- Bowser DN, Khakh BS (2007) Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4212–4217.
- Chen X, Wang L, Zhou Y, Zheng LH, Zhou Z (2005) “Kiss-and-run” glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 25:9236–9243.
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278:1354–1362.
- Crippa D, Schenk U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, Pozzan T, Matteoli M, Carmignoto G (2006) Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol* 570:567–582.
- Demaurex N, Frieden M (2003) Measurements of the free luminal ER Ca²⁺ concentration with targeted “cameleon” fluorescent proteins. *Cell Calcium* 34:109–119.
- Domercq M, Brambilla L, Pilati E, Marchaland J, Volterra A, Bezzi P (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor- α and prostaglandins. *J Biol Chem* 281:30684–30696.
- Fernández-Alfonso T, Ryan TA (2004) The kinetics of synaptic vesicle pool depletion at CNS synaptic terminals. *Neuron* 41:943–953.
- Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J (1994) Neurotransmitter release: fusion or ‘kiss-and-run’? *Trends Cell Biol* 4:1–4.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2006) Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54:676–690.
- Gaffield MA, Betz WJ (2006) Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protoc* 1:2916–2921.
- Harata NC, Aravanis AM, Tsien RW (2006) Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* 97:1546–1570.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009–1031.
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315–344.
- Hirase H, Qian L, Barthó P, Buzsáki G (2004) Calcium dynamics of cortical astrocytic networks *in vivo*. *PLoS Biol* 2:E96.
- Jaiswal JK, Fix M, Takano T, Nedergaard M, Simon SM (2007) Resolving vesicle fusion from lysis to monitor calcium-triggered lysosomal exocytosis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14151–14156.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exo-

- cytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331–339.
- Mattheyses AL, Axelrod D (2006) Direct measurement of the evanescent field profile produced by objective-based total internal reflection fluorescence. *J Biomed Opt* 11:014006.
- Misenböck G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195.
- Nadrigny F, Li D, Kemnitz K, Ropert N, Koulakoff A, Rudolph S, Vitali M, Giaume C, Kirchhoff F, Oheim M (2007) Systematic colocalization errors between acridine orange and EGFP in astrocyte vesicular organelles. *Biophys J* 93:969–980.
- Ni Y, Malarkey EB, Parpura V (2007) Vesicular release of glutamate mediates bidirectional signaling between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 103:1273–1284.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, Helmchen F (2004) Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1:31–37.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 17:7817–7830.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21:477–484.
- Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86:369–408.
- Ryan TA, Reuter H (2001) Measurements of vesicle recycling in central neurons. *News Physiol Sci* 16:10–14.
- Sala C, Roussignol G, Meldolesi J, Fagni L (2005) Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca²⁺ homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci* 25:4587–4592.
- Sankaranarayanan S, Ryan TA (2000) Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol* 2:197–204.
- Sankaranarayanan S, Ryan TA (2001) Calcium accelerates endocytosis of vSNAREs at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 4:129–136.
- Schweizer FE, Ryan TA (2006) The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 16:298–304.
- Steyer JA, Almers W (2001) A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:268–275.
- Striedinger K, Meda P, Scemes E (2007) Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca²⁺ oscillations and cell migration. *Glia* 55:652–662.
- Thomas D, Lipp P, Tovey SC, Berridge MJ, Li W, Tsien RY, Bootman MD (2000) Microscopic properties of elementary Ca²⁺ release sites in non-excitable cells. *Curr Biol* 10:8–15.
- Tovey SC, de Smet P, Lipp P, Thomas D, Young KW, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB, Berridge MJ, Thuring J, Holmes A, Bootman MD (2001) Calcium puffs are generic InsP(3)-activated elementary calcium signals and are downregulated by prolonged hormonal stimulation to inhibit cellular calcium responses. *J Cell Sci* 114:3979–3989.
- Tse FW, Tse A, Hille B, Horstmann H, Almers W (1997) Local Ca²⁺ release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron* 18:121–132.
- Tsuboi T, Rutter GA (2003) Multiple forms of “kiss-and-run” exocytosis revealed by evanescent wave microscopy. *Curr Biol* 13:563–567.
- Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* 21:717–726.
- Voglmaier SM, Kam K, Yang H, Fortin DL, Hua Z, Nicoll RA, Edwards RH (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron* 51:71–84.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626–640.
- Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, Han X, Kang J, Takano T, Nedergaard M (2006) Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci* 9:816–823.
- Winship IR, Plaa N, Murphy TH (2007) Rapid astrocyte calcium signals correlate with neuronal activity and onset of the hemodynamic response *in vivo*. *J Neurosci* 27:6268–6272.
- Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS (2006) Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 174:803–813.
- Xiao B, Tu JC, Petralia RS, Yuan JP, Doan A, Breder CD, Ruggiero A, Lanahan AA, Wenthold RJ, Worley PF (1998) Homer regulates the association of group I metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21:707–716.
- Xu J, Peng H, Kang N, Zhao Z, Lin JH, Stanton PK, Kang J (2007) Glutamate-induced exocytosis of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 282:24185–24197.
- Zenisek D, Steyer JA, Almers W (2000) Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406:849–854.
- Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M, Krzan M, Li N, Sul JY, Halassa M, Van Bockstaele E, Zorec R, Haydon PG (2004) Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 279:12724–12733.
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9:945–953.

SUPPORTING INFORMATIONS

Fig 1 SI

A



B

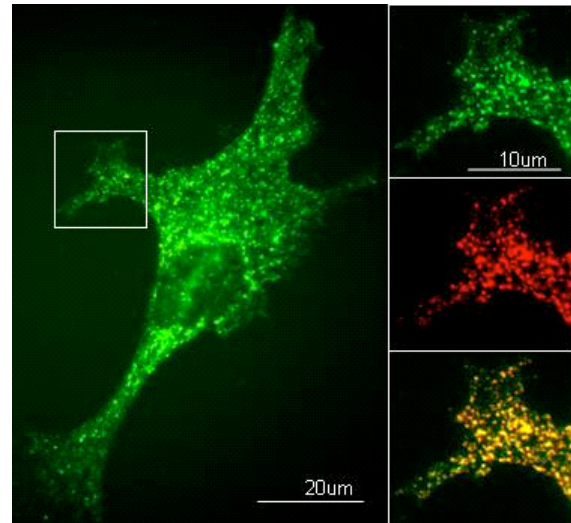


Fig 1 SI

VGLUT1-pHluorin largely co-localizes with endogenous cellubrevin.

A-B. Images of two astrocytes transfected with cellubrevin-EGFP (A, green transfected cell) and VGLUT1-pHluorin (B, green transfected cell). The punctate GFP signal (green dots) and the immunofluorescent signal for endogenous VGLUT1 (A, red dots) and for endogenous cellubrevin, (B, red dots) largely co-localize (yellow dots, co-localization VGLUT1 vs cellubrevin-EGFP: $96\pm 3\%$; cellubrevin vs VGLUT1-pHluorin: $90\pm 7\%$, $n=10$ cells). Double immunofluorescent labeling was performed on rat cortical astrocyte cultures fixed in 4% p-formaldehyde and subsequently incubated with a guinea pig antibody directed against VGLUT1 and cellubrevin (1:500, Chemicon; 1:1000, Synaptic Systems GmbH) or with a rabbit antibody directed against GFP (1:500, Chemicon), visualized with Cy3- or Alexa 488-conjugated secondary antibodies (1:200; Molecular Probes). Scale bar, 20 μm .

Fig 2 SI

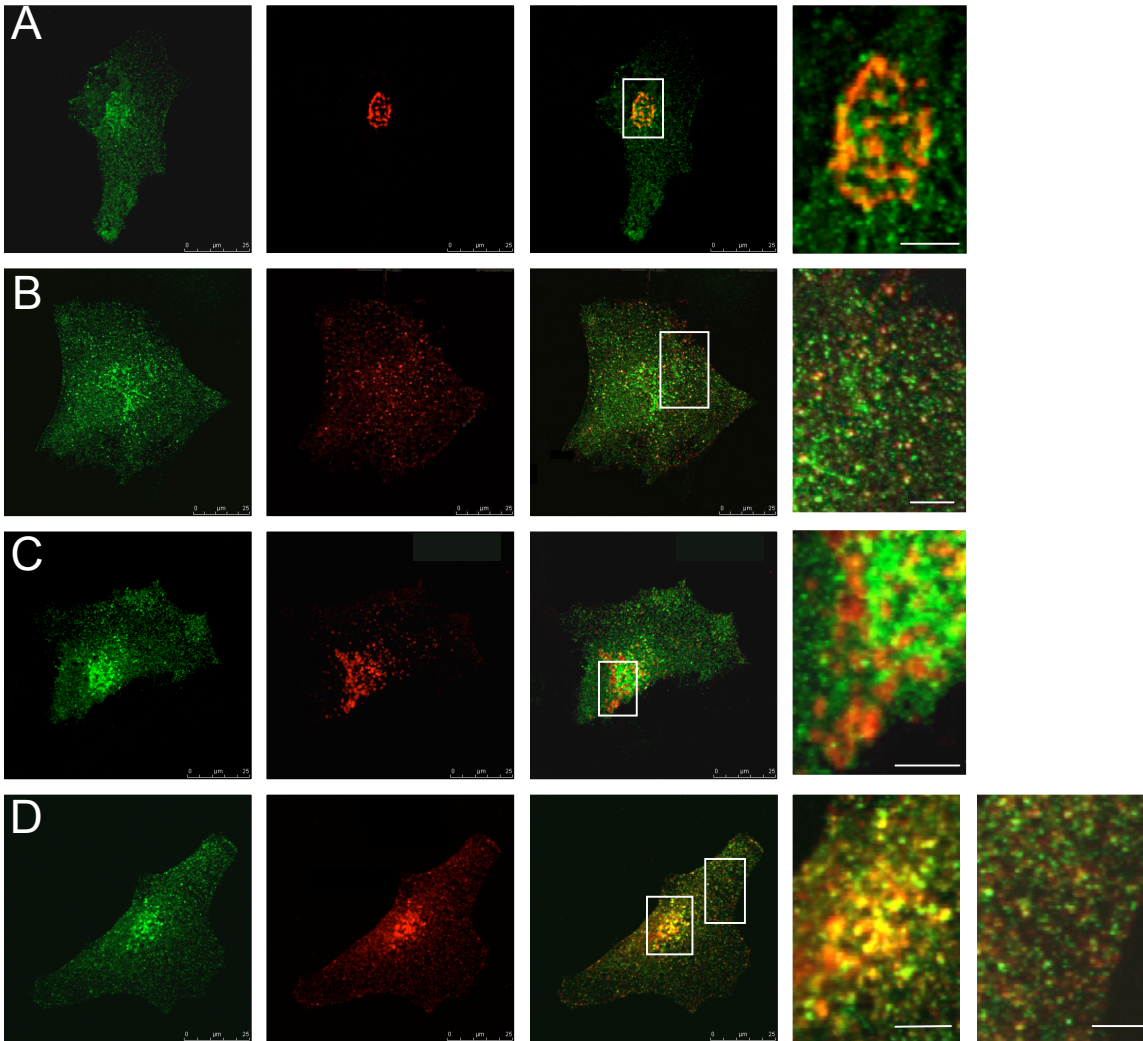


Fig 2 SI

The intracellular distribution of VGLUT1-pHluorin.

In this figure the left panels (green A, B, C, D) show astrocytes transfected with VGLUT1-pHluorin construct revealed by rabbit antibody against GFP (1:500, Chemicon). The middle panels show (red) the markers of the organelles, revealed by mouse antibodies against specific markers of A. trans-Golgi network (tgn38; 1:1000, Alexis Biochemicals); B. early endosomes (EAA1; 1:100, BD Transduction Lab); C. late endosomes, multivesicular bodies and lysosomes (lamp1; 1:100, Calbiochem) D. recycling endosomes (transferrin receptor; 1:100, Invitrogen). The right panels show the merged images. The boxed regions in the merged images correspond to the high magnifications on the right. Double immunofluorescent labeling was performed on rat cortical astrocyte cultures that were fixed in 4% p-formaldehyde and subsequently incubated with antibodies directed against GFP and specific markers, visualized with Cy3- or FITC-conjugated secondary antibodies (1:200; Molecular Probes). Bars: 5 μ m.

Fig 3 SI

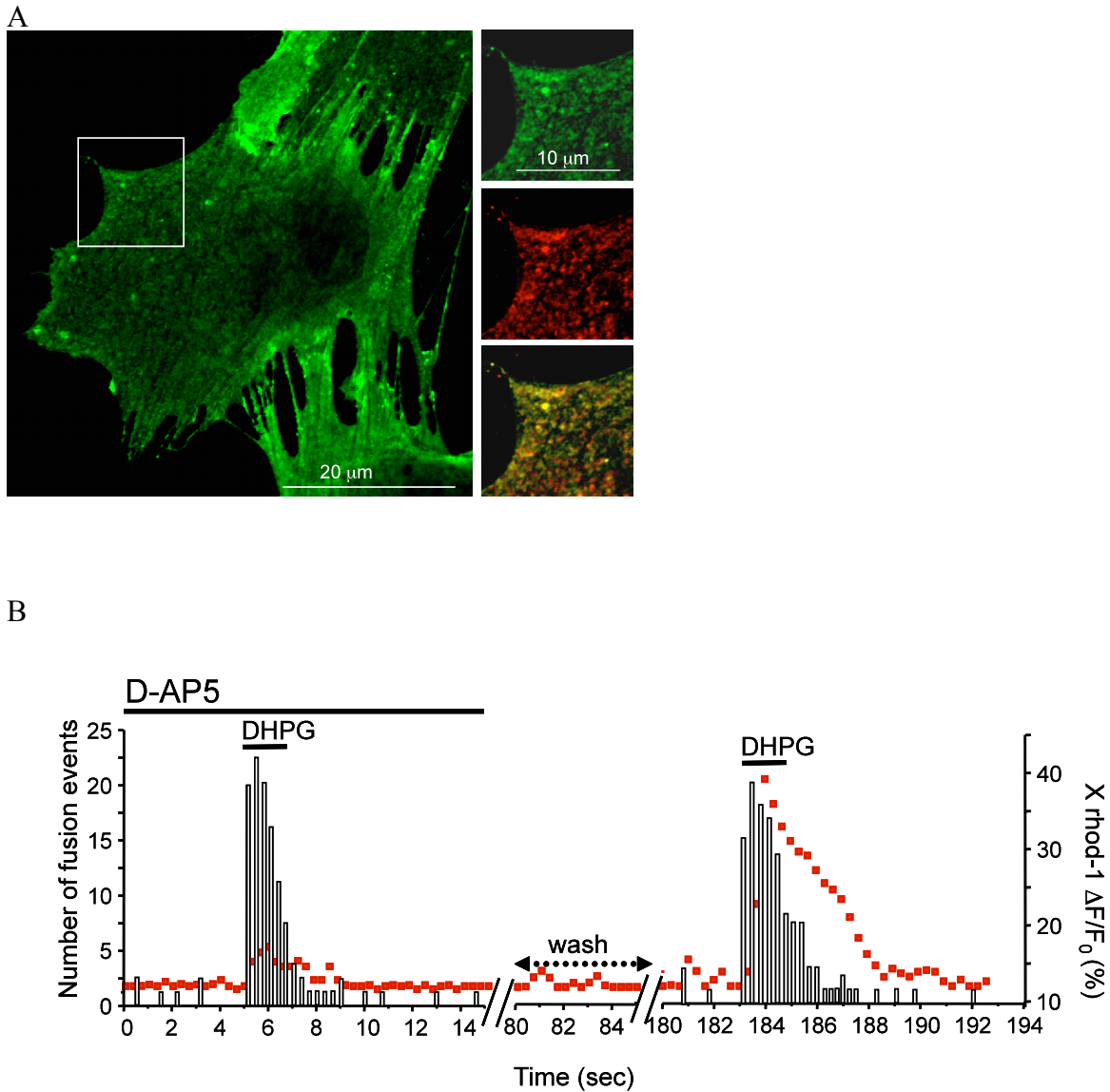


Fig 3 SI

VGLUT1-positive vesicles contain glutamate

A. Double immunofluorescent labeling of endogenous VGLUT1 (green dots) and endogenous glutamate (red dots). Note that in the merge image green dots and red dots largely co-localize (yellow dots, co-localization VGLUT1 vs glutamate: $88 \pm 8\%$; $n = 5$ cells). Double immunofluorescent labeling was performed on rat cortical astrocyte cultures fixed in 4% p-formaldehyde and subsequently incubated with a guinea pig antibody directed against VGLUT1 and with a purified rabbit antibody against glutamate (1:500, Chemicon; 1:3000, Vidar Gundersen's lab, batch n 607), visualized with Alexa 488 or Cy3-conjugated secondary antibodies (1:200; Molecular Probes). **B.** Dual shutter TIRF and EPI fluorescence allows parallel monitoring of vesicles secretion in a VGLUT1-pHluorin-expressing astrocyte and $[Ca^{2+}]_i$ in a INS-1 cell forming an isolated pair in low density astrocyte-INS 1 cell co-cultures (Domercq et al., *JBC*, 2006). For experiments astrocytes have been plated (2.5×10^4 cells) on glass coverslips and used 3-4 days

after transfection with VGLUT1-pHluorin, INS-1 cells were plated on the transfected astrocytes (INS-1E cell line obtained from Dr CB Wollheim, CMU, UNIGE, Switzerland: 2.5×10^4 cells) and were used the next day. For experiments where single cell $[Ca^{2+}]_i$ has been measured with EPI illuminations, cells have been loaded with 2.5 mg/ml X-rhod-1 AM (Molecular Probes) for 20 min at 37 °C in a HEPES-KRH buffer (see material and methods) and allowed to de-esterify for 20 min before imaging. During experiments (performed at 37 °C) cells were continuously perfused with HEPES-KRH (about 1ml/min) and stimuli were rapidly (2 s) applied via a software-controlled micro-perfusion fast-step device (100 μ l/min, Warner Instrument Corp.). The figure shows one experiment, representative of 4, in which DHPG induces fusion events in the astrocyte (240 ± 38 , $n=4$) followed by NMDAR-dependent $[Ca^{2+}]_i$ elevation (at peak: $34 \pm 8 \Delta F/F_0$ %) in the INS-1 cell (average peak_{pHluorin}-to-peak_{[Ca²⁺]_i} delay: 120 ± 60 ms). The same stimulation induced 260 ± 40 fusion events ($n=7$) in untransfected astrocytes, followed by NMDAR-dependent $[Ca^{2+}]_i$ elevations (at peak: $38 \pm 12 \Delta F/F_0$ %) in the INS-1 cell (average peak_{pHluorin}-to-peak_{[Ca²⁺]_i} delay: 125 ± 56 ms). Black histograms represent number of fusion events attributed to VGLUT1-pHluorin- positive vesicles in the astrocytes and the red dashed line represents $[Ca^{2+}]_i$ changes in the INS-1 cell, expressed as $\Delta F/F_0$ % of X-rhod-1 fluorescence. Cells were pulsed twice with DHPG (100 μ M) with an interposed washing period (about 3-5 min). In the presence of the NMDAR antagonist D-AP5 (100 μ M), DHPG induces a burst of fusion events in the astrocyte and no significant $[Ca^{2+}]_i$ elevation in the INS-1 cell. Upon washout of D-AP5, DHPG was able to evoke fusion events immediately followed by $[Ca^{2+}]_i$ elevation in the INS-1 cell.

Fig 4 SI

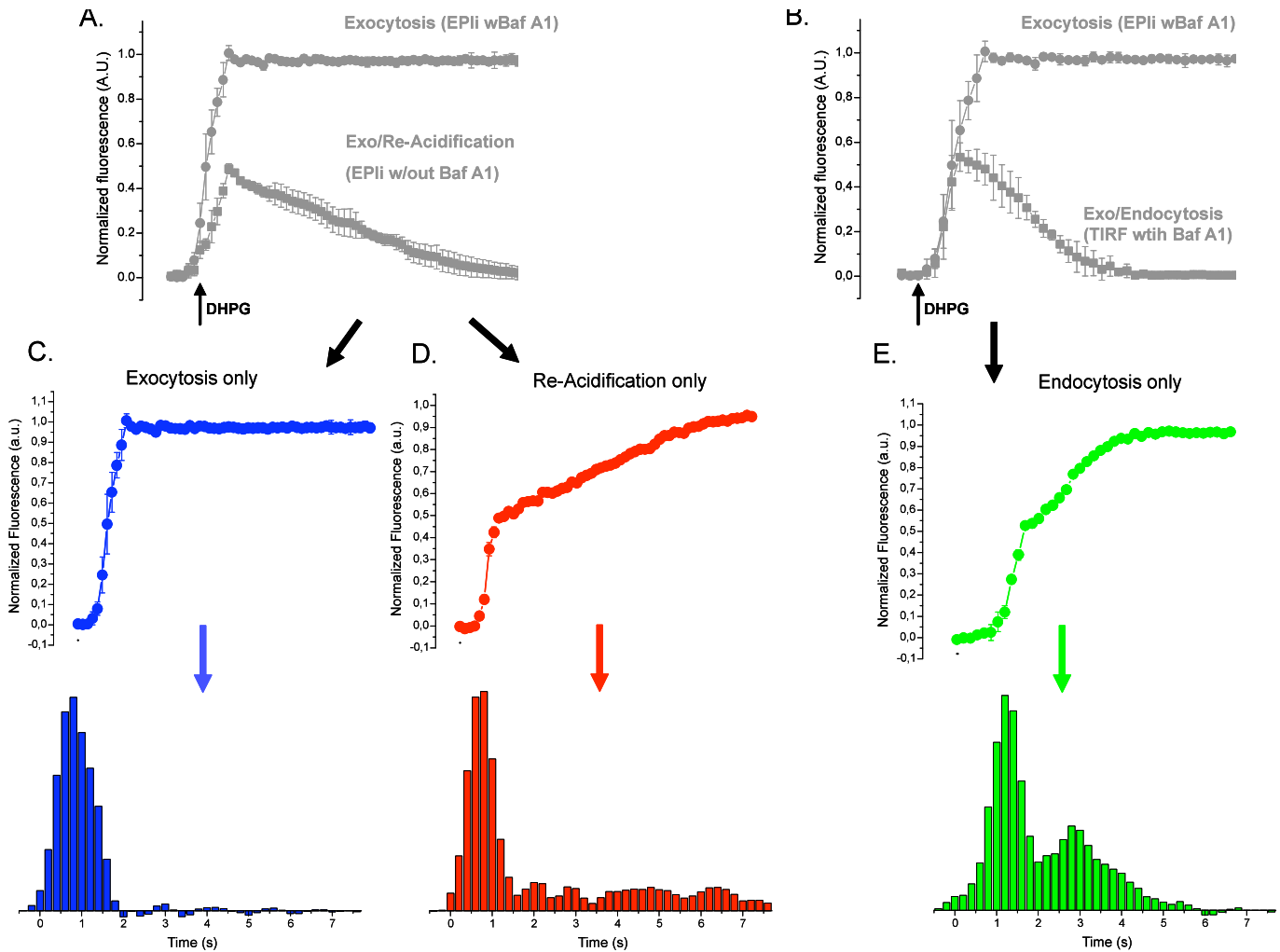


Fig 4 SI

Real-time measurements of exo-endocytosis and re-acidification of SLMVs in astrocytes

Astrocytes transfected with VGLUT1-pHluorin have been stimulated with DHPG (100 μ M) and imaged with TIRF and EPI illuminations (TIRFi and EPIi). The curves of the DHPG-evoked pHluorin fluorescence (pHF) signal represents at all times the net balance of exocytosis ($EXO(t)$), endocytosis and re-acidification. In particular, 1. under EPIi we can observed the exocytosis ($EXO(t)$) and the decay of pHF after fusion pore closure and re-acidification ($ENDO'(t)$); 2. under TIRFi we can observed exocytosis ($EXO(t)$) and two different processes that characterize the endocytic pathway: the fluorescence decay after fusion pore closure and re-acidification ($ENDO'(t)$) and fluorescence decay due to movement out of the evanescent wave (EW) field ($MOV(t)$). Thus, the pHF under EPIi represent $EXO(t)-ENDO'(t)$; under TIRFi represents $EXO(t)-ENDO'(t)-MOV(t)$. Bafilomycin A1, a v-type ATPase inhibitor, blocks their proton pump and prevents re-acidification, trapping VGLUT1-pHluorin-expressing vesicles in the fluorescent state. Thus, when BafA1 is present under EPIi there is only $EXO(t)$ and under TIRFi there is only $EXO(t)-MOV(t)$ components left. In order to obtain information about the kinetics of re-acidification and endocytosis compared EPI and TIRF curves that have been normalized to the maximum measured with each EPI and TIRF methods, respectively. The maximum we chose represent the maximum amount of vesicles which

undergo fusion in each case. In the case of EPI_i, we simply took the maximum of the EPI trace after the stimulus in the presence of BafA1; in the case of TIRF_i, finding the maximum was more difficult because a fraction of vesicles move out from the EW field because of the $MOV(t)$. In order to obtain the maximum value, images in the first 800 ms after the stimulus were superposed with Photoshop by using the “exclusion” method. Once determined the EPI and TIRF maximum value, we normalized the curves and proceeded with the comparisons.

- A. Superposition of EPI_i curves obtained in the presence (wBafA1, the same of Fig 3C SI) and in the absence (w/out BafA1) of BafA1 (5 μM).

We have first analyzed the cumulative curve obtained with BafA1. The fluorescence signal in each point of the curve represents the time course of exocytosis processes:

$$FwBaf(t) = EXO(t)$$

By calculating the first derivative of the curve we obtained the temporal distribution of exocytic events (blue histograms).

Next we analyzed curve obtained without BafA1. In this case the fluorescence signal represents the result of the two competitive exo-re-acidification processes:

$$Fw/outBaf(t) = EXO(t) - ENDO'(t)$$

Thus, by subtracting fluorescence without BafA1 from that with BafA1 we obtained a curve representing only re-acidification (Fig 2D SI, red curve).

$$FwBaf(t) - Fw/outBaf(t) = ENDO'(t)$$

By calculating the first derivative we obtained the temporal distribution of re-acidification processes.

- B. Superposition of EPI_i and TIRF_i curves obtained in the presence of BafA1 (EPIwBafA1 and TIRFwBafA1).

The TIRFwBafA1 represents the results of the two competitive exocytosis and movement out of the EW field:

$$FTIRFwBaf(t) = EXO(t) - MOV(t)$$

Thus, by subtracting TIRFwBafA1 from that of EPIwBafA1 ($EXO(t)$) we obtained a curve representing only the movement out of the EW field or the first step of endocytosis (Fig 2E SI, green curve).

$$FwBaf(t) - FTIRFwBaf(t) = MOV(t)$$

Finally, by calculating the first derivative we obtained the temporal distribution of endocytic events (green histograms).

.

.

Fig 5 SI

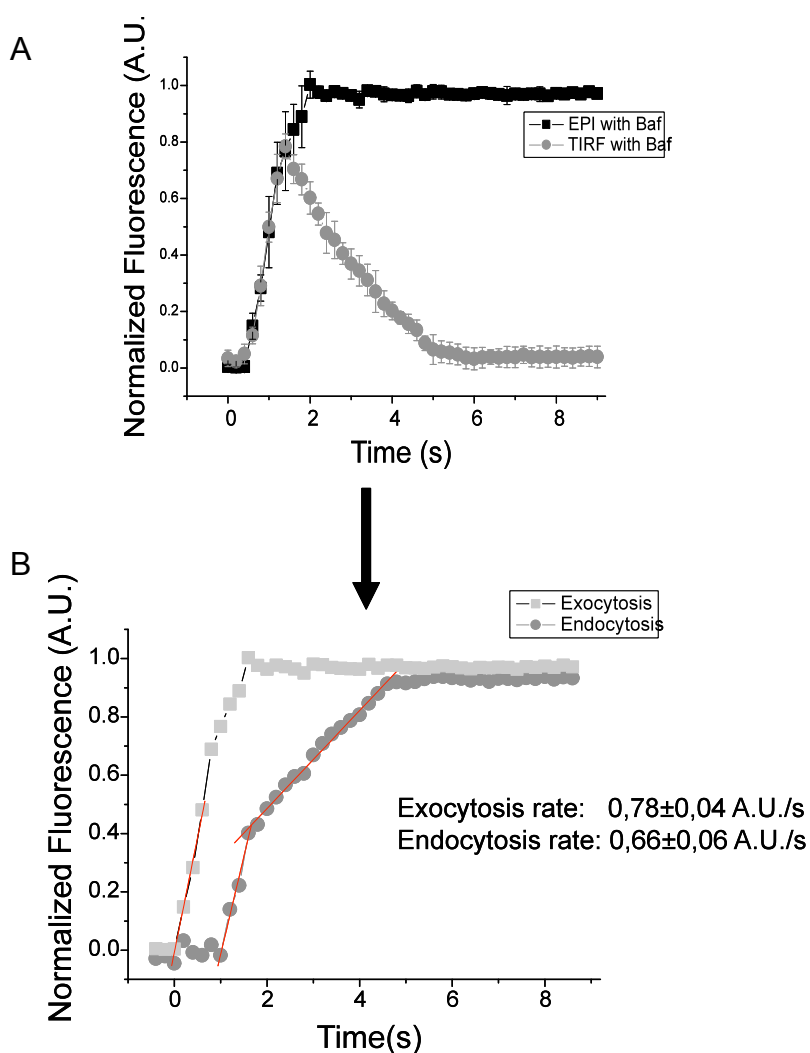


Fig 5 SI

Real-time measurements of exo-endocytosis evoked by 1mM DHPG

The application of 1 mM DHPG did not cause more fluorescence increase than 100 μ M (Fig 1F in the main text). In order to determine whether this result was due to saturation of exocytosis, or an accelerating endocytosis, we performed a set of experiments where we calculated the kinetics of endocytosis upon stimulation with 1 mM of DHPG. We combined EPIi and TIRFi (10 Hz) and monitored pHF changes under basal conditions and upon stimulation with DHPG in the absence and in the presence of Baf A1 (Fig 4 SI A). We normalized curves to the maximum measured with each EPI and TIRF methods (as before) and calculated the kinetics of endocytosis (Fig 4 SI B). We found that the curves for both exocytosis and endocytosis show rates similar to the ones calculated for 100 μ M DHPG (exocytosis= 0.78 ± 0.04 A.U./s vs 0.77 ± 0.056 A.U./s for 1 mM and 100 μ M respectively; endocytosis= 0.66 ± 0.06 vs 0.66 ± 0.025 for 1 mM and 100 μ M respectively, Fig 4 SI B). These evidences bring us to the conclusion that, with a high dose of DHPG, the exocytosis is most probably saturated.

Fig 6 SI

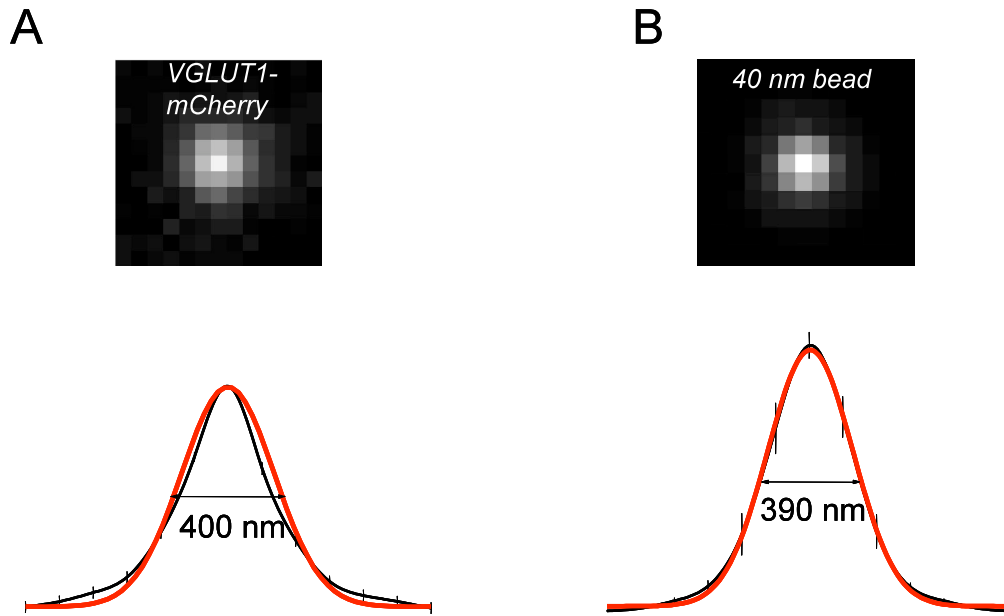


Fig 6 SI

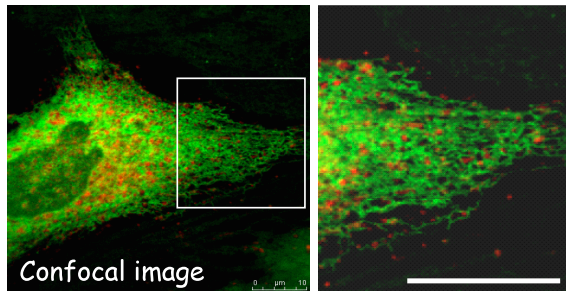
Estimation of the size of fluorescent spots corresponding to individual SLMVs

The best way to distinguish a single vesicle from a group of vesicles is to choose fluorescent spots appearing randomly in the TIRF field during an imaging period. Such spots represent cytosolic vesicles entering the EW field and approaching the plasma membrane (the so called “newcomer” vesicles (Zenisek et al., 2000). **A.** Analysis of “newcomer” vesicles was performed in VGLUT1-mCherry-expressing astrocytes by plotting fluorescence intensity of VGLUT1-mCherry spots against distance from the centre of the spot (black curve \pm SD). Such an analysis provided an estimation of the “radial sweep” (Zenisek et al., 2002). The fluorescence intensity values obtained from the radial sweep were well fitted by a one-dimensional Gaussian function (red curve). Such a curve, shown below a representative image of a VGLUT1-mCherry-expressing SLMV, represents the average radial sweep value obtained from 18 SLMVs. **B.** We compared the half maximum value of the curve in A (400 ± 50 nm) with the corresponding value of radial sweep curves of fluorescent beads of different diameter and found correspondence with the value of 40 nm beads (390 ± 20 nm, $n=10$; Fig 1 SI B). Thus, this analysis provides an estimated diameter for glutamatergic SLMVs that corresponds to the one measured in electron micrographs of both tissue and cultured astrocytes (~ 40 nm; Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007) and supports the conclusion that fluorescent spots with diameter of about 3 pixels (378 nm) correspond to individual SLMVs.

Fig 7 SI

A

Astrocyte expressing ER-EGFP and VGLUT-mCherry



B

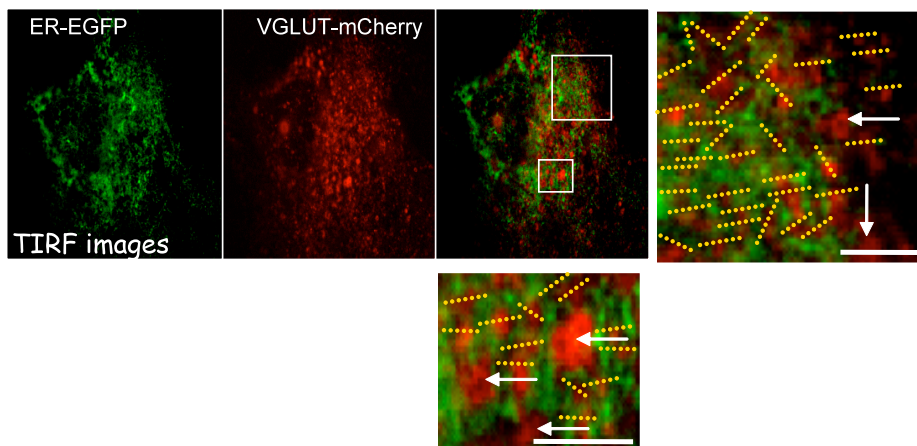


Fig 7 SI

Analysis of spatial relation between ER and SLMVs

A. The figure shows a confocal image representing one astrocytes double transfected with ER-GFP and VGLUT1-mCherry. The magnification of the boxed region shows the distribution of ER tubuli and SLMVs. Bar: 8 μm . **B.** TIRF images of an astrocyte expressing ER-EGFP and VGLUT1-mCherry. The high magnifications of the boxed regions represent the overlay of the two images. Bar: 3 μm . The yellow dashed lines represent the line intensity profiles we traced between any red dots representing one vesicles (all red dots with about 3 pixel of diameter; about 500 of vesicles analyzed in 6 cells, about 87% of red dots located in the EW field) and the nearest green structures. Note that some red dots with diameter bigger than about 3 pixels were excluded from the analysis (those indicated by the white flashes and representing about 1/10 of the all red dots image with TIRFi).

Fig 8 SI

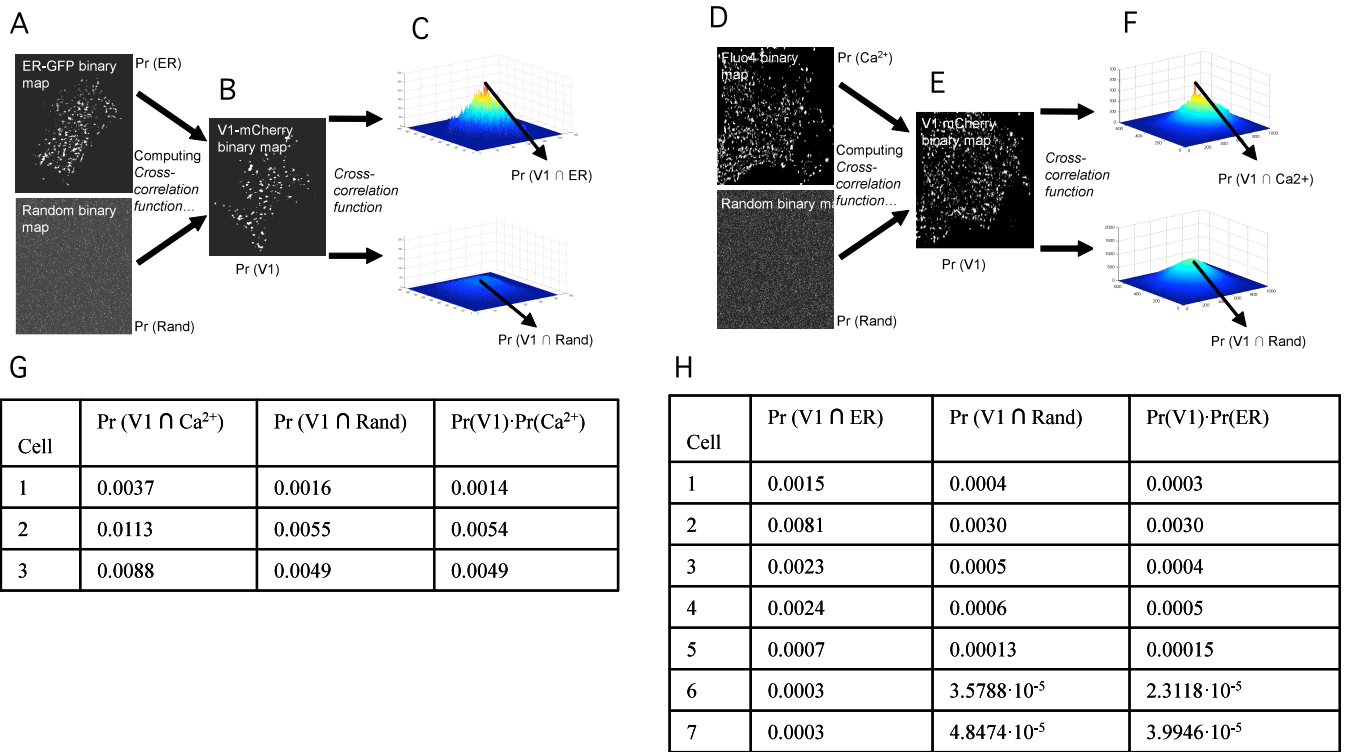


Fig. 8 SI

ER and sub-membrane Ca²⁺ events are spatially correlated with SLMVs.

The figure represents a cross correlation analysis performed between TIRF images representing ER-GFP and VGLUT1-mCherry (A-C, G) and between sub-membrane Fluo4 events and VGLUT1-mCherry (D-F, H). **A-B**. Binary map obtained from: ER-GFP image (A, top); random binary map with the same pixel density as the corresponding green one (A, bottom); random binary map obtained from a VGLUT1-mCherry image (B). **C**. On top: 3D representation of the cross-correlation function obtained from the cross correlation analysis of the ER-GFP map and VGLUT1-mCherry. On the bottom: same as on top but between the random map and the VGLUT1-mCherry map (on bottom). **D-E**. Binary map obtained from: sub-membrane Fluo4 events (D, top); random binary map with the same pixel density as the corresponding green one (D, bottom); random binary map obtained from a VGLUT1-mCherry image (E). **F**. On top: 3D representation of the cross-correlation function obtained from the cross correlation analysis of the Fluo4 map and the VGLUT1-mCherry map. On the bottom: same as on top but between the random map and the VGLUT1-mCherry map (on bottom). **G**. Probability values from the binary maps and the cross correlation analysis of ER-GFP and VGLUT1-mCherry. **H**. Probability values from the binary maps and the cross correlation analysis of Fluo4 and VGLUT1-mCherry.

The cross correlation analysis has been performed between TIRF images representing ER-GFP and VGLUT1-mCherry (A-C, G) and between sub-membrane Fluo4 events and VGLUT1-mCherry (D-

F, H) with the aim at clarifying whether the two images have a “random” or a “non-random” distribution, or in other words whether the two images are spatially correlated. Cross correlation is a standard method to estimate the degree to which two numerical series are correlated. If the two signals are images, this function is no more a vector but a matrix, and the correlation between the two numerical series is evaluated as function of their spatial distance. Basically, to estimate cross correlation, each of the images is divided into rectangular blocks. Each block in the first image is correlated with its corresponding block in the second image to produce the cross correlation as a function of position. The cross correlation may therefore be used to determine the degree of similarity between two similar images, or, with the addition of a linear offset to one of the images, the spatial shift or spatial correlation between the images. In our experiments, if the ER tubuli or the sub-membrane Ca^{2+} events are located or occur in defined positions closed by to SLMVs, the cross correlation analysis will define that the two images are spatially correlated.

To perform the analysis, images in the first sec after the stimulus (DHPG 100 μM) both the Fluo4 and VGLUT1-mCherry have been superimposed with Photoshop. The aim was to add to the first image after the stimulus only the new fluorescent events (new vesicles or new Ca^{2+} events) appearing in the EW in the following images. To evaluate the probability of finding a vesicle, a ER tubule or a Ca^{2+} event, images were filtered to maximize the SNR and then transformed in binary maps (1 = signal, 0 = background, Fig 6SI A, B, D, E). Probabilities were calculated as the number of white pixel on the total number of pixel of the image. To estimate the probabilities of the intersection (i.e. how many pixels of the VGLUT1-mCherry map are close to the ones of ER-GFP or Ca^{2+} binary map) images were cross correlated. 3D representations of cross correlation function are showed in Fig 6SI C and F. In C on top, the cross-correlation between ER-GFP map and VGLUT1-mCherry map presents a peak near the center of the function, meaning that the maximum level of correlation exists when the two maps are shifted of few pixels. On the bottom, the cross correlation function between a random binary map with the same pixel density of the ER-GFP map has a flat shape, suggesting that for every (x,y) shift there is almost the same correlation. We used a random binary map as a control to show that, for a random map, the definition of “stochastic independence” is confirmed: in fact, $\Pr(V1 \cap \text{Rand}) \approx \Pr(V1) \cdot \Pr(\text{ER})$, as $\Pr(\text{Rand}) = \Pr(\text{ER})$, because they have the same pixel density. Results of the probability analysis are in table G. In F on top, the cross-correlation between Fluo4 map and VGLUT1-mCherry map present a peak in the center of the function, meaning that the maximum level of correlation exists when the two maps are overlapped. On the bottom, the cross correlation function between a random binary map with the same pixel density of the ER-GFP map has a flat shape, suggesting that for every (x,y) shift there is almost the same correlation. We used this as control to show that, for a random map, the definition of “stochastic independence” is confirmed: in fact, $\Pr(V1 \cap \text{Rand}) \approx \Pr(V1) \cdot \Pr(\text{ER})$, as $\Pr(\text{Rand}) = \Pr(\text{ER})$, because they have the same pixel density. Results of the probability analysis are in table H.

Fig 9 SI

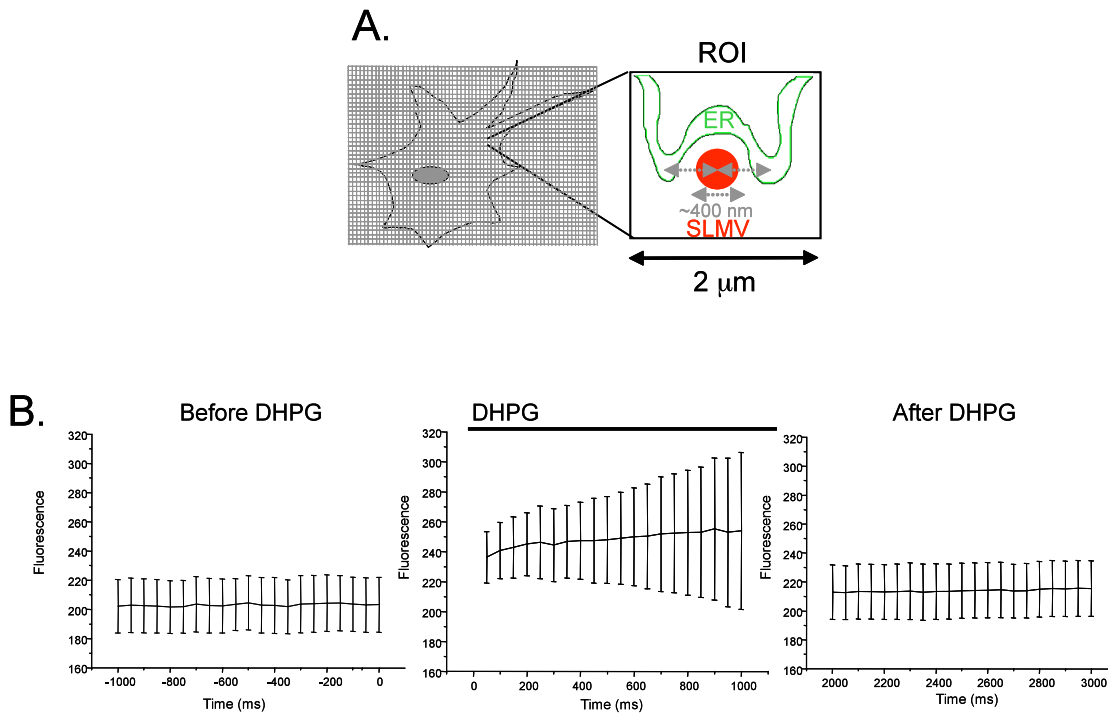


Fig 9 SI

DHPG induces a transient increase in the average Fluo4 fluorescence signal

A. Diagram illustrating our method of analysis. Left: the entire profile of an astrocyte appearing in the field of view is subdivided in squared, equal-sized ROIs (diameter: 2 μm). Right: high magnification of an individual ROI, typically containing one SLMV and one surrounding ER structure. **B.** Comparison of the average Fluo4 sub-membrane fluorescence signal (F) in 1s periods taken before, during and after application of DHPG (100 μM). F corresponds to the mean fluorescence value (± SEM) given by the sum of the signals from individual ROIs divided by the number of ROIs (n = 25 cells). The fluorescence signal during DHPG application is significantly higher than before or after the drug (p<0.05, m-ANOVA).

Fig 10 SI

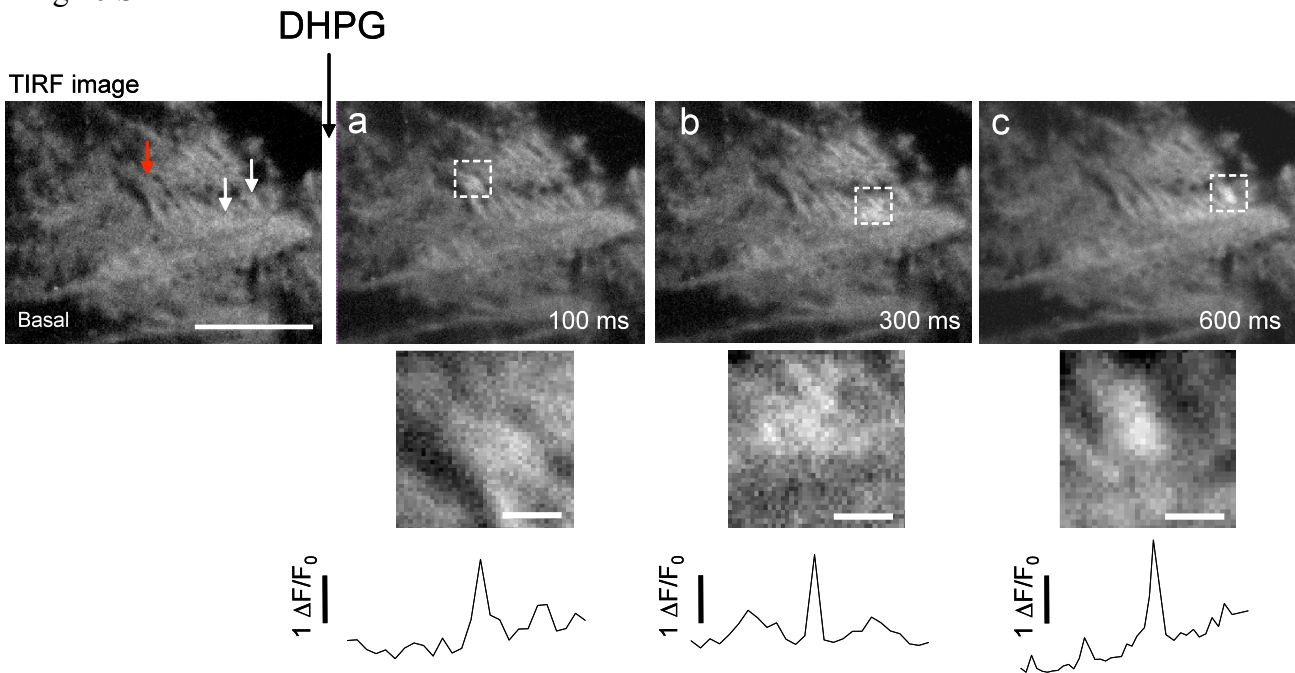


Fig 10 SI

Sub-membrane calcium events are visible in cell regions with different basal F_0

Sequence of TIRF images representing one astrocyte before (basal) and after (100 ms, 300 ms, 600ms) DHPG (100 μ M, 2s). In the first TIRF image the astrocyte loaded with Fluo4-AM shows basal F_0 of different intensities; in particular white arrows indicate two zones of higher F_0 with respect to red arrow. Local stimulation with DHPG induces the appearance of sub-membrane calcium signals (indicated by the dashed ROIs) in regions with both high F_0 (b,c) and low F_0 (a). On the bottom, the high magnification of the ROIs in the above images and the kinetics of sub-membrane calcium signals expressed as $\Delta F/F_0$. Note that the three sub-membrane calcium events display similar amplitudes.

Fig 11 SI

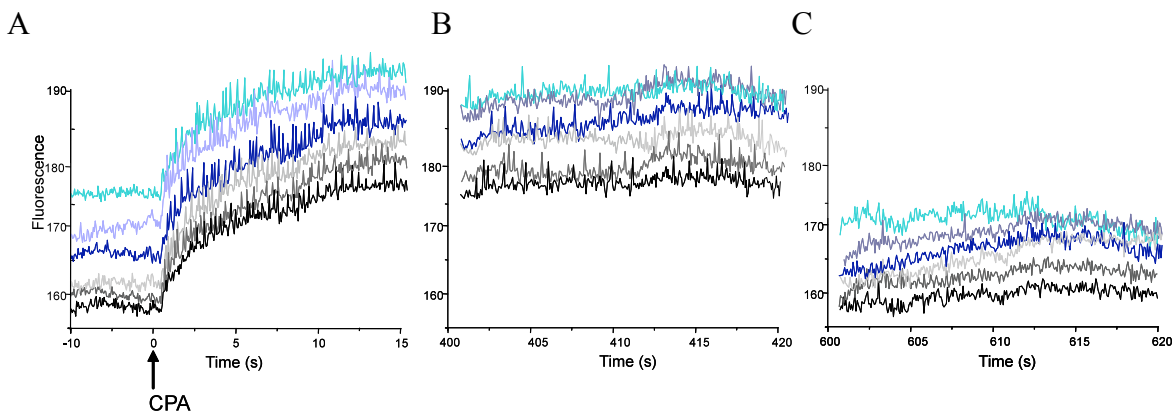


Fig 11 SI

Sub-membrane Ca^{2+} events are specifically triggered by the release of calcium from the ER tubules

Experiments performed under TIRFi. **A.** Six representative traces of sub-membrane Ca^{2+} changes, each one showing periods before (-10 - 0 s) and after (0-15 s) the bulk application of cyclopiazonic acid (CPA 10 μ M, 15 min of incubation). **B.** Sub-membrane Ca^{2+} changes in the same ROIs then A. after 400-420 s from the application of CPA; **C.** Sub-membrane Ca^{2+} changes in the same ROIs then A. and B. after 600-620 s from the application of CPA. Note that sub-membrane Ca^{2+} events visible in A and in B are almost completely disappeared in C.

Table 1

Exocytosis (EPIBaf)			
		SE	
Rate	0.77	0.056	A.U./s
Tau rise 0-800 ms	0.24	0.017	s
Inflection point	800		ms
Endocytosis (EPIBafNorm-TIRFBafNorm)			
<i>Early</i>		SE	
Rate	0.66	0.025	A.U./s
Tau rise 800-1200 ms	0.26	0.03	s
Inflection point	1200		ms
<i>Late</i>		SE	
Rate	0.16	0.005	A.U./s
Tau rise 2000-2800 ms	1	0.25	s
Inflection point	2800		ms
Re-acidification (EPIBafNorm-EPINorm)			
<i>Early</i>		SE	
Rate	0.6	0.007	A.U./s
Tau rise 0-800 ms (cytosolic pool)	0.22	0.02	s
Inflection point	800		ms
<i>Late</i>			
Rate	0.052	0.0008	A.U./s

Table 1 – Rates and time constant of exocytosis, endocytosis and re-acidification of SLMVs evoked by DHPG 100 μ M

Material and Methods

Image analysis

The quantitative measurements of the whole-cell pHF signal intensity in individual cells were obtained by positioning the regions of interests (ROI) manually around the perimeter of the cell. Cells exceeding in size the field of view (FOV, 520x696 pixels) were excluded during the selection procedure. Temporal dynamics were expressed as background-subtracted $\Delta F/F_0$, where F_0 represents the fluorescence level of the cells before stimulation, and ΔF represents the change in fluorescence occurring during stimulation. To define the kinetics of exocytosis and endocytosis separately (Sankaranarayanan and Ryan, 2000), we proceeded considering the following points: a. pHluorins are pH-sensitive versions of GFP with pK of ~ 7.1 , therefore they undergo a large change in fluorescence as they transit from the vesicle lumen (pH ~ 5.5) to the surface membrane (pH 7.4) during exocytosis; b. in cultured astrocytes expressing VGLUT-pHluorin, exocytosis is associated to an increase in fluorescence as the pHluorin moiety is externalized and deprotonated; c. likewise, endocytosis followed by reacidification is associated to a decline in fluorescence as the pHluorin moiety is internalized into vesicles and protonated; d. since reacidification is rapid, the time course of fluorescence recovery can be used as a direct measure of endocytosis. Thus, we considered the pHF signal ($F(t)$) as given by the difference of two competing processes, exocytosis and endocytosis ($F(t) = Exo(t) - Endo(t)$). In the presence of Baf A1, the signal is given only by exocytosis ($F_{baf}(t) = Exo(t)$). An estimate of the time course of endocytosis was therefore obtained as the difference signal ($F(t) - F_{baf}(t) = Endo(t)$). To facilitate comparison, the curves in the presence and absence of Baf A1 were normalized to the maximum fluorescence obtained with Baf A1 for each cell. Errors were expressed as standard error of the mean.

Fittings of the pHF curves were performed as follows: a. exponential fit to the initial 1.2 s after start of the stimulus (Fig 1B); b. exponential fit to the initial 800 ms after start of the stimulus (Fig 1C and 1D); c. linear fit to the initial 1.2-1.6 s after start of the stimulus (Figs 1C, 1D, Fig 6); d. linear fit to the second phase of the endocytosis curve (1.2-10 s; Fig 6); e. single exponential decay to the fluorescence recovery (Fig. 1B).

The dynamics of individual SLMVs was studied in TIRF experiments by monitoring pHluorin and/or mCherry fluorescence in a circle (diameter: 630 nm) positioned on top of the spot and in a concentric annulus (inner diameter: 630 nm; outer diameter: 1260 nm) (Bezzi et al., 2004; Zenisek et al., 2000). Fluorescence changes were expressed as background-subtracted $\Delta F/F_0$ as above. An event was counted as “fusion event” when the pHF signal of a single SLMV increased over basal by ≥ 4 -fold. The fluorescence intensity changes of FM 4-64 in VGLUT1-pHluorin-expressing vesicles was analyzed by positioning a circle (diameter 630 nm) centered on each such vesicle.

To evaluate the spatial relation between ER and SLMVs in the sub-membrane compartment we used images of astrocytes doubly transfected with ER-GFP and VGLUT1-mCherry acquired under TIRFi. The images were spatially filtered with both a wiener filter (adaptive filter, to maximize the SNR) and a symmetrical gaussian filter with a high kernel (in order to obtain a background-like image) using a custom-made Matlab function. To calculate the surfaces of discrete ER-GFP structures we applied a threshold to the images in order to obtain a binary map (1 = ER, 0 = background). Only the pixels attributed to ER were counted (1 pixel = 15876 nm²). To calculate the distance between any given red VGLUT1-mCherry-positive SLMV and its closest green ER-GFP structure, we started with TIRF images in the red channel and we traced line intensity profiles (yellow dashed lines in Fig 4B SI) from any red dots recognized as single vesicle (all red dots with about 3 pixel of diameter; about 500 of vesicles analyzed in 6 cells, about 87% of red dots located in the EW field). Then, we overlap the green image and we rotate each line intensity profile towards the nearest green structure. We took each profile and at the end we analyzed all the data. The

analysis has been therefore performed on entire images and not on selected vesicles; the red dots excluded from the analysis (about 1/10 of all red dots imaged with TIRFi) are those whose diameter is bigger than 3 pixels (i.e., those most likely representing lysosomes and/or endosomes expressing VGLUT1-mCherry, see white arrows in Fig 7 SI). For cross-correlation analysis between ER-GFP and VGLUT1-mCherry, please refer to Fig 8 SI.

The temporal dynamics of sub-membrane Ca^{2+} were followed as Fluo4 or X-rhod-1 fluorescence intensity changes in experiments performed with single and dual-wavelength TIRFi (488/568 nm). To identify sub-membrane Ca^{2+} events, we subdivided the entire surface of non-transfected cells in equal, squared ROIs of $4 \mu\text{m}^2$ via MetaMorph software. This size was selected because it corresponds to an area often containing at least one SLMV with one surrounding ER tubule (see diagram in Fig 9 SI A and analysis in Fig 3 in the main text). For analysis, we proceeded as follows: a. at first we measured the fluorescence signal intensity in each ROI at 3 different times: 1 s before DHPG application, during application of the drug, and after its application. We then averaged the signal among ROIs for each of the 3 conditions and made a statistical comparison of the averaged signals (Fig 2 SI B); b. by means of a retrospective analysis, we centered a ROI ($4 \mu\text{m}^2$) on each visualized Ca^{2+} event and analyzed the fluorescence signal expressed as background-subtracted $\Delta F/F_0$ using a custom-made Matlab function. To overcome the fact that cells have flattened membrane at the footprint, and that sometime the calcium dye can cluster around/at some intracellular compartments, the sub-membrane calcium signals obtained in each ROI, have been expressed as $\Delta F = F - F_0$ divided by F_0 , where the F_0 is the (background subtracted) mean of about 1 s of basal level of calcium signal in each ROI before the stimulus. Transient increases (hot-spots) of Fluo4 or X-rhod-1 fluorescence (in experiments at both 20 Hz and 40 Hz) were recognized as sub-membrane Ca^{2+} events when $\Delta F/F_0$ exceeded F_0 by ≥ 2 -fold. To define the extent of propagation in the x-y plane of individual sub-membrane Ca^{2+} events, we centered manually 3 concentric ROIs (diameter: $2 \mu\text{m}$, $4 \mu\text{m}$, $6 \mu\text{m}$) on each Ca^{2+} signal and calculated the spread of the signal using MetaMorph. For cross-correlation analysis between sub-membrane Ca^{2+} signals and VGLUT1-mCherry, please refer to Fig 8 SI.

The spatial-temporal correlation of SLMVs and sub-membrane Ca^{2+} events were monitored in ROIs of $6 \mu\text{m}$ diameter centered on top of the SLMV. We assumed that an area of $36 \mu\text{m}^2$ contains at least one SLMV and two surrounding Ca^{2+} events (the diameter of most Ca^{2+} events is $\leq 3 \mu\text{m}$; see Fig 4). For spatial correlation, we traced a line intensity profile (MetaMorph) over the red (mCherry) SLMV signal and the closest Fluo4 (green) fluorescence signal, as detailed above. Our analysis included both “resident” and “newcomer” SLMVs (see Fig 2D).

The synchrony between Ca^{2+} event and SLMV fusion was estimated by measuring the relative timing between the Ca^{2+} peak and the moment when the pHF signal of a single SLMV increased over basal by ≥ 4 -fold. By means of a retrospective analysis we centered ROIs ($36 \mu\text{m}^2$) on top of pHF fusion events and we selected Ca^{2+} events within the ROI with the following characteristics: time-to-peak: up to 100 ms; total duration: up to 150 ms; x-y propagation: $\leq 3 \mu\text{m}$.

2.4. Caractérisation des SLMVs glutamatergiques

La sécrétion régulée des astrocytes peut être soutenue par différents types d'organelle dont les SLMVs mais également les DCGs et les lysosomes (Coco et al., 2003; Bezzi et al., 2004; Crippa et al., 2006; Jourdain et al., 2007; Striedinger et al., 2007; Zhang et al., 2007; Li et al., 2008). La plupart des études portant sur la sécrétion régulée des astrocytes n'a pas tenu compte de cette hétérogénéité en utilisant des rapporteurs génériques de la sécrétion. Bien que ces études ont permis de confirmer l'existence d'une sécrétion régulée dans les astrocytes, elles n'ont pas permis d'obtenir un tableau clair des modalités de cette sécrétion à cause des contributions variables des différents types d'organelles. Le contenu des vésicules de sécrétion reste également débattu. Si, de manière générale, il semble que les SLMVs supportent la libération de petites molécules comme le glutamate ou la D-sérine et les vésicules de taille plus importante (DCGs et lysosomes) la libération d'ATP ou de peptides, il n'y a pas encore de clair consensus en la matière. Concernant la libération du glutamate, le meilleur indicateur qu'une vésicule de sécrétion peut contenir du glutamate (et donc le libérer éventuellement) reste l'expression des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGluTs). L'étude de l'expression des VGluTs dans les astrocytes *in situ* grâce à la microscopie électronique a montré que les vésicules VGluTs positives étaient de petites vésicules, non denses aux électrons, d'une taille similaire à celle des SVs et situées à proximité de la membrane plasmique (Bezzi et al., 2004; Bergersen and Gundersen, 2009) et qui ont donc été catégorisée comme SLMVs. Dans les astrocytes en culture, les études de microscopie électroniques (Bezzi et al., 2004) ont également montré l'existence de ces SLMVs. Pour autant, ces études ne permettent pas d'affirmer que seules les SLMVs expriment les VGluTs. Certaines études ont montré que des vésicules beaucoup plus larges pouvaient libérer du glutamate (Chen et al., 2005; Xu et al., 2007), bien que la nature de ces organelles n'ait pas été définie et qu'il semble que les lysosomes n'expriment pas les VGluTs (Zhang et al., 2007; Li et al., 2008). Il était donc essentiel de déterminer si d'autres compartiments intracellulaires exprimaient les VGluTs et définir s'il était possible de distinguer avec certitude les SLMVs glutamatergiques afin d'en suivre la sécrétion régulée de manière spécifique.

2.4.1. Matériels et méthodes

Les matériels et méthodes utilisés pour ces expériences sont similaires à ceux utilisés dans Cali et al., 2008, Marchaland et al., 2008 et Supplementary information from Marchaland et al., 2008.

2.4.2. Expression des VGluTs sur les différents compartiments intracellulaires

Nous avons donc, dans un premier temps, étudié l'expression des VGluTs au niveau des différents compartiments intracellulaires. Pour cela, nous avons réalisé différents marquages immunocytochimiques contre les VGluTs (ainsi que pour les différentes constructions VGluT1-pHluorin, VGluT2-eGFP et VGluT1-mCherry) et des marqueurs des différents compartiments intracellulaires. La colocalisation entre les vésicules VGluTs positives (ou les vésicules exprimant les constructions) et celles exprimant les autres marqueurs a été faite par cross-corrélation.

De manière générale, l'expression des VGluTs (ou des constructions) colocalise fortement (~90% ; fig1SI de Marchaland et al., 2008 pour illustration) avec la cellubrevine et contiennent du glutamate (~90% ; Fig 3SI de Marchaland et al., 2008 pour illustration) confirmant que l'expression des VGluTs est caractéristique de vésicules capables d'accumuler le glutamate et de fusionner. L'expression des VGluTs sur les endosomes tardifs, les « multivesicular bodies » et les lysosomes ainsi que sur le réseau transgolgien est négligeable (respectivement 6% et 8% ; Fig 2SI de Marchaland et al., 2008 pour illustration). Nous avons, par contre, observé une expression des VGluTs sur les « recycling endosomes » et les endosomes précoces (respectivement 35% et 20% ; Fig 2SI de Marchaland et al., 2008 pour illustration). Ainsi, parmi les différents types de compartiments, seuls trois d'entre eux expriment les VGluTs : les SLMVs, les endosomes précoces et les « recycling endosomes ».

2.4.3. Caractérisation des compartiments VGluTs positifs

Dans la mesure où nous avons observé trois types de compartiments exprimant les VGluTs, il était essentiel de clarifier si ces compartiments représentaient des populations distinctes de vésicules.

Nous avons dans un premier temps comparé les endosomes précoces exprimant les VGluTs (vésicules doubles positives pour VGluT et EEA1, un marqueur des endosomes précoces) et les SLMVs (vésicules positives pour VGluTs et négatives pour EEA1). Nous avons estimé le profil moyen de fluorescence (radial sweep ; Zenisek et al., 2002) pour ces deux types vésicules. Nous avons ensuite comparé la largeur à mi-hauteur de ces profils (full width at half maximum ou FWHM, **figure 16**) avec celle de billes fluorescentes de différents diamètres. Pour les vésicules VGluTs positives qui expriment EEA1, leur largeur à mi-hauteur (490 ± 5 nm, $n=20$; figure 16) correspond avec celle des billes de 200nm de diamètre (506 ± 6 nm, $n=20$; figure 16). Pour les vésicules VGluTs positives qui n'expriment pas EEA1, leur largeur à mi-hauteur correspond à celle des billes de 40nm de diamètre comme on pouvait le supposer (349 ± 7 nm et 361 ± 6 nm respectivement, $n=20$, figure 16).

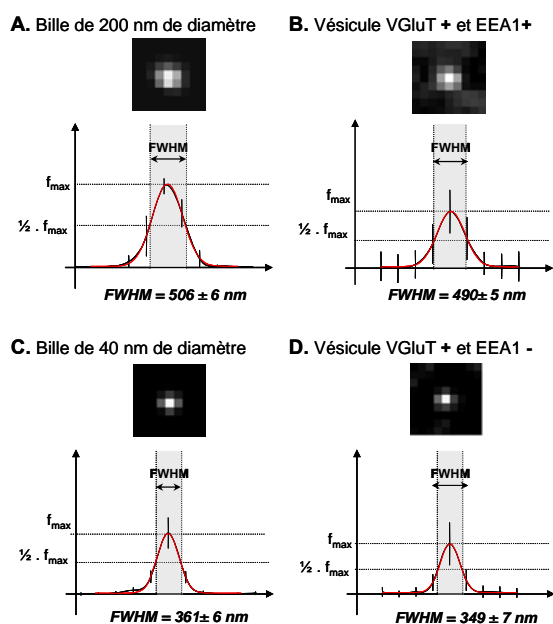


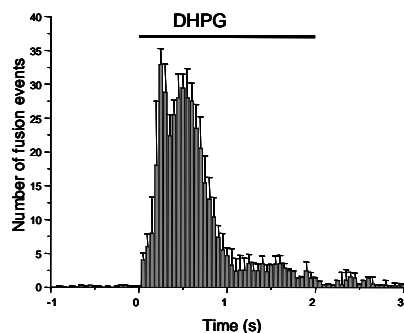
Figure 16. Estimation de la taille des vésicules exprimant les VGluTs.

L'analyse des organelles individuelles est faite sur des images au confocal. Le profil de fluorescence a été réalisé en déterminant l'intensité de la fluorescence le long d'une ligne passant par le centre des vésicules exprimant les VGluTs ou des billes fluorescentes de différents diamètres (courbe noire, moyenne \pm SD, $n=20$ organelles/billes). Ce type d'analyse permet de déterminer le profil de fluorescence moyen ou « radial sweep » (Zenisek et al., 2002). Ces courbes peuvent être assimilées à une courbe de Gauss (courbe rouge). La largeur à mi-hauteur ou FWHM (full width at half maximum) permet de comparer les profils entre eux. La FWHM des vésicules positives pour VGluT et EEA1 est similaire à celle des billes de 200nm de diamètre (490 ± 5 nm et 506 ± 6 nm ; respectivement; en A et B) alors que celle des vésicules uniquement positives pour VGluT est similaire à celle des billes de 40nm de diamètre (349 ± 7 nm et 361 ± 6 nm ; respectivement; en C et D).

Les endosomes précoces exprimant les VGLuTs et les SLMVs glutamatergiques sont donc des vésicules de taille très différentes et représentent deux compartiments vésiculaires distincts. Il est très probable que les VGLuTs présents sur ces endosomes précoces représentent les transporteurs en cours de recyclage ou de dégradation.

Nous avons dans un second temps comparé les « recycling endosomes » exprimant les VGLuTs (vésicules doubles positives pour VGLuT et TfR, le récepteur de la transferrine, un marqueur des « recycling endosomes ») et les SLMVs glutamatergiques (vésicules positives pour VGLuTs et négatives pour TfR). Nous avons, de la même façon, estimé le profil moyen de fluorescence et comparé la largeur à mi-hauteur de ces profils. Ces deux types de vésicules sont de taille similaire (349 ± 7 nm et 352 ± 5 nm respectivement, $n=20$). Comme il n'est pas possible de distinguer ces deux populations par des critères de taille ou d'expression des VGLuTs, nous avons voulu déterminer si ces « recycling endosomes » pouvaient également participer à la sécrétion régulée du glutamate. Pour cela, nous avons transfecté des astrocytes avec le VGLuT1-pHluorin et nous les avons incubés avec la transferrine couplée à un fluorophore (Alexa-Tf568), pendant une heure, ce qui permet de charger les « recycling endosomes » (Park et al., 2006). Nous avons ensuite observé la sécrétion induite par le DHPG (2s, $100\mu\text{M}$) en temps réel avec la microscopie TIRF (avec deux longueurs d'ondes : 488nm pour le VGLuT1-pHluorin et 568nm pour l'Alexa-Tf568). Le DHPG induit un « burst » d'exocytose des vésicules exprimant le VGLuT1-pHluorin similaire à celui décrit dans Marchaland et al., 2008. Seulement une faible proportion des vésicules qui fusionnent sont positives pour la transferrine (9.5% ; **figure 17**).

A. VGLuT1-pHluorin-positive organelles



B. VGLuT1-pHluorin/Alexa-Tf 568-positive organelles

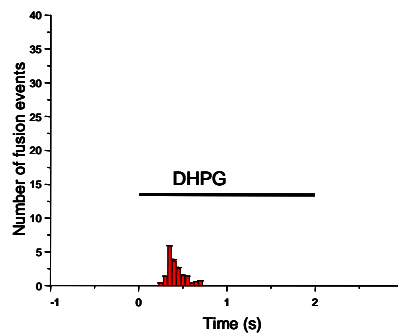


Figure 17. Distribution temporelle des événements de fusion induits par l'application de DHPG (2s, $100\mu\text{M}$) impliquant des vésicules exprimant le VGLuT1-pHluorin et contenant l'Alexa-Tf 568.

Chaque histogramme représente le nombre de fusions détectées en fonction du temps (moyenne \pm SD ; acquisition chaque 50ms, $n=5$ cellules). **A.** Distribution des fusions impliquant les vésicules exprimant le VGLuT1-pHluorin. **B.** Distribution des fusions impliquant les vésicules exprimant le VGLuT1-pHluorin et contenant l'Alexa-Tf 568.

Il semble donc que les « recycling endosomes » possédant les VGLuTs n'interviennent que très peu dans la sécrétion régulée. Il est difficile de définir si ces vésicules doubles positives pour les VGLuTs et le TfR sont des SLMVs qui posséderaient une capacité de recyclage ou si ce sont des « recycling endosomes » possédant les VGLuTs et la capacité de fusionner.

2.4.4. Relation entre SLMVs et DCGs

Si les SLMVs sont les vésicules de sécrétion les mieux caractérisés des astrocytes, ces derniers possèdent également un autre compartiment capable de soutenir une sécrétion régulée : les DCGs. Les DCGs des astrocytes ont été identifiés par Calegari en 1999 (Calegari et al., 1999) sur des cultures d'astrocytes hippocampaux par un marquage de la SgII. Différents sécrétagogues (ionomycine, dibutyryl-cAMP et bradykinine) induisent la libération de la SgII de manière calcium dépendante. Par la suite, il a été montré que ces DCGs pouvaient contenir et libérer l'ATP (Coco et al., 2003). Il a également été montré que les DCGs astrocytaire pouvaient libérer de manière calcium dépendante différents peptides comme le ANP (Krzan et al., 2003) ou le NPY (Ramamoorthy and Whim, 2008). La phogrin, une glycoprotéine membranaire de ces granules (Taupenot et al., 2003) ainsi que les trois granines « classiques » : chromogranin A, chromogranin B and secretogranin II sont les principaux marqueurs de ces DCGs (Gerber and Sudhof, 2002).

Dans la mesure où les DCGs participent activement à la sécrétion régulée des astrocytes, il nous semblait important de mieux définir la relation entre les SLMVs et les DCGs afin de confirmer 1. qu'il s'agissait bien de deux populations distinctes d'organelles et 2. que la sécrétion des DCGs ne pouvait pas interférer avec celle des SLMVs lors de notre étude de cette dernière.

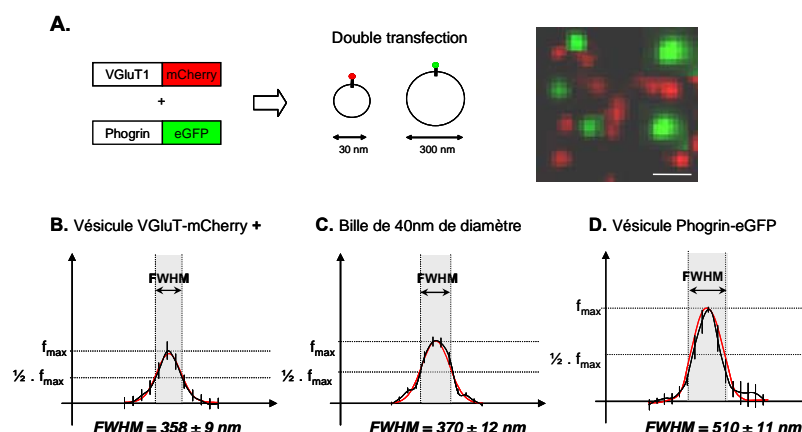


Figure 18. Estimation de la taille des vésicules exprimant VgluT1-mCherry et Phogrin-eGFP.

L'analyse des organelles individuelles est faite sur des images au TIRF d'astrocytes double transfecté avec VGlut1-mCherry et Phogrin-eGFP (A). Le profil de fluorescence a été réalisé en déterminant l'intensité de la fluorescence le long d'une ligne passant par le centre des vésicules exprimant les VGlut1 ou des billes fluorescentes de différents diamètres (courbe noire, moyenne \pm SD, $n=80$ organelles/billes). Ce type d'analyse permet de déterminer le profil de fluorescence moyen ou « radial sweep » (Zenisek et al., 2002). Ces profils de fluorescence peuvent être assimilés à une courbe de Gauss (courbe rouge). La largeur à mi-hauteur ou FWHM (full width at half maximum) permet de comparer les profils de fluorescence entre eux. La FWHM des vésicules exprimant VGlut1-mCherry est similaire à celle des billes de 40 nm de diamètre ($358 \pm 9 \text{ nm}$ et $370 \pm 12 \text{ nm}$, respectivement, en B et C) et très différente de celle des vésicules exprimant la Phogrin-eGFP ($510 \pm 11 \text{ nm}$, en D).

Nous avons donc, dans un premier temps, transfecté des astrocytes avec la phogrin-eGFP et le VGlut1-mCherry, deux marqueurs des DCGs et des SLMVs respectivement. Les deux marqueurs ne colocalisent pas (colocalisation 2.6%, $n=6$ cellules) et les vésicules exprimant le VGlut1-mCherry ont

une taille similaire à une bille de 40nm de diamètre (358 ± 9 nm et 370 ± 12 nm respectivement ; $n = 85$) et différente de celle de DCGs exprimant la phogrin-eGFP (510 ± 11 nm $n=74$) (**Figure 18**).

Les SLMVs et DCGs sont donc deux populations d'organelles distinctes exprimant différents marqueurs et de tailles différentes.

Afin de déterminer si la sécrétion des DCGs pouvait interférer avec celle des SLMVs lors de notre étude de cette dernière, lors de la mise en place du protocole de chargement de la FM4-64 dans les astrocytes, nous avons évalué la répartition de la FM4-64 dans les différents compartiments intracellulaires et estimer son efficacité à charger les SLMVs en déterminant la colocalisation de la FM4-64 avec un rapporteur des SLMVs, le VGluT2-eGFP (plus de 90% de la FM4-64 est présente dans les SLMVs glutamatergiques ; Cali et al., 2008). Nous avons également pu constater l'absence de chargement de la FM4-64 dans les DCGs grâce à la phogrin-eGFP probablement due au fait que les DCGs ne réalisent pas plusieurs cycles de sécrétion. Par ailleurs, en utilisant la phogrin-pHluorin (du groupe du Prof. Romano Regazzi, DBCM, Unil), nous avons pu observer que, si le DHPG provoquait la sécrétion des DCGs, les dynamiques de cette sécrétion étaient très différentes de celle des SLMVs. Comparée à celle des SLMVs, la sécrétion des DCGs est beaucoup plus lente (maximum autour de 50s) et moins synchrone (pas de « burst » d'exocytose).

L'ensemble de ces données confirme que les SLMVs et les DCGs constituent bien de deux populations distinctes d'organelles qu'il est facile de distinguer grâce à des marqueurs différents mais également grâce à leur différence de taille. Les SLMVs et les DCGs sont capables de participer à la sécrétion régulée des astrocytes mais avec des dynamiques très distinctes permettant de séparer clairement les deux processus.

2.4.5. Conclusion

L'expression des VGluTs au niveau des différents compartiments intracellulaires nous a permis de déterminer que les SLMVs n'étaient pas le seul compartiment intracellulaire à exprimer les VGluTs. Deux autres compartiments expriment les VGluTs de manière significative : les endosomes précoces et les « recycling endosomes ». La seule expression des VGluTs n'est donc pas un critère suffisant pour pouvoir distinguer les SLMVs. Il faut également tenir compte du profil de fluorescence des vésicules pour pouvoir exclure les endosomes précoces. La distinction entre les SLMVs et les « recycling endosomes » possédant les VGluTs est plus difficile mais ne devrait pas être problématique pour notre étude car ils n'interviennent que très peu dans la sécrétion régulée.

Nous avons également montré que les SLMVs et les DCGs constituaient bien deux populations distinctes intervenant dans des processus de sécrétion très différents. Nous pouvons donc apporter une description assez complète des SLMVs glutamatergiques qui permet de pouvoir, sans équivoque, distinguer les SLMVs glutamatergiques des autres organelles astrocytaires.

3. DISCUSSION

Les astrocytes, contrairement aux neurones, ne sont pas excitables électriquement. Ils sont, néanmoins, capables de libérer différentes substances, dont certaines sont neuroactives, par sécrétion régulée. De grandes différences existent entre la sécrétion régulée astrocytaire et la sécrétion régulée synaptique à commencer par le fait que le couplage stimulus/sécrétion des astrocytes n'est pas lié à l'ouverture de canaux membranaires voltage dépendants mais médié par l'activation des GPCRs et la libération du calcium à partir des réserves intracellulaires. La caractérisation des propriétés spatio-temporelles des processus d'exocytose, d'endocytose et de recyclage des organelles impliquées dans la libération des gliotransmetteurs est fondamentale pour comprendre le mode de communication de ces cellules et l'implication que celle-ci peut avoir dans le fonctionnement cérébral que ce soit dans la transmission et l'intégration de l'information ou lors de conditions pathologiques.

Cela fait déjà plusieurs années que la libération de gliotransmetteurs par exocytose régulée a été identifiée dans les astrocytes Cette sécrétion régulée des astrocytes peut être soutenue par différents types d'organelle dont les SLMVs mais également les DCGs et les lysosomes (Coco et al., 2003; Bezzi et al., 2004; Crippa et al., 2006; Jourdain et al., 2007; Striedinger et al., 2007; Zhang et al., 2007; Li et al., 2008). La plupart des études portant sur la sécrétion régulée des astrocytes n'ont pas tenu compte de cette hétérogénéité et ont utilisé des rapporteurs génériques de la sécrétion. Bien que ces études aient permis de confirmer l'existence d'une sécrétion régulée dans les astrocytes, elles n'ont pas permis d'obtenir un tableau clair des modalités de cette sécrétion à cause des contributions variables des différents types d'organelles.

Nous avons donc développé deux nouvelles stratégies expérimentales pour permettre une étude plus fine des différents processus impliqués dans la sécrétion régulée. Pour cela, nous avons adapté des stratégies récemment développées pour l'étude de la sécrétion régulée des neurones et des cellules neurosécrétrices : l'utilisation des colorants styryls (Harata et al., 2001; Zenisek et al., 2002; Aravanis et al., 2003) et, par la suite, l'utilisation de la pHluorin (Sankaranarayanan and Ryan, 2000; Atluri and Ryan, 2006; Schweizer and Ryan, 2006; Voglmaier et al., 2006).

3.1. Caractérisation des SLMVs glutamatergiques

Notre première exigence concernant les protocoles de chargement ou de marquage était leur spécificité. Pour obtenir des données cohérentes sur la sécrétion régulée, il nous fallait absolument cibler un seul type de compartiment intracellulaire.

Il nous a donc fallu, dans un premier temps, définir la nature exacte des SLMVs glutamatergiques et vérifier qu'elles constituaient bien une population homogène de vésicules distincte des autres populations d'organelles intracellulaires. Les principaux marqueurs des SLMVs glutamatergiques sont les VGluTs. L'étude de l'expression des VGluTs dans les astrocytes *in situ* grâce à la microscopie électronique a montré que les vésicules VGluTs positives étaient des petites vésicules, non denses aux électrons, d'une taille similaire à celle des SVs et situées à proximité de la

membrane plasmique (Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007; Bergersen and Gundersen, 2009) et qui ont donc été catégorisées comme SLMVs. Dans les astrocytes en culture, les études de microscopie électroniques (Bezzi et al., 2004) ont également montré l'existence de ces SLMVs. Pour autant, ces études ne permettent pas d'affirmer que seules les SLMVs expriment les VGluTs. Il était donc essentiel de déterminer si d'autres compartiments intracellulaires exprimaient les VGluTs et définir s'il était possible de distinguer avec certitude les SLMVs glutamatergiques afin d'en suivre la sécrétion régulée de manière spécifique.

Nous avons donc réalisé différents marquages immunocytochimiques afin de définir la nature de compartiments intracellulaires exprimant les VGluTs. Cela nous a permis de déterminer que les SLMVs n'étaient pas le seul compartiment intracellulaire à exprimer les VGluTs. Deux autres compartiments expriment les VGluTs de manière significative : les endosomes précoces et les « recycling endosomes ». La seule expression des VGluTs n'est donc pas un critère suffisant pour pouvoir distinguer les SLMVs.

Nous avons donc également analysé les profils de fluorescence des différentes organelles possédant les VGluTs et nous les avons comparé à ceux de billes fluorescentes de différents diamètres. Les endosomes précoces ont un profil de fluorescence similaire à celui des billes de 200nm alors que les SLMVs ont un profil de fluorescence similaire à celui des billes de 40nm. Ils représentent donc une population d'organelles différente de celle des SLMVs. L'analyse des profils de fluorescence est donc un critère supplémentaire pour pouvoir distinguer les SLMVs.

Par contre, les « recycling endosomes » ont un profil de fluorescence similaire à celui des SLMVs. Les organelles qui expriment les VGluTs et également le TfR constituent 35% des organelles exprimant les VGluTs mais correspondent seulement à 9.5% des événements de fusion induits par la stimulation de GPCRs. Pour autant, il est difficile de définir si ces vésicules doubles positives pour les VGluTs et le TfR et qui fusionnent lors de la stimulation sont des SLMVs qui posséderaient une capacité de recyclage ou si ce sont des « recycling endosomes » possédant les VGluTs et la capacité de fusionner. Dans la mesure où leur participation à la sécrétion régulée reste minime, elle ne devrait pas être problématique lors de notre étude.

Nous avons également étudié la relation entre les SLMVs et les DCGs qui représentent également une catégorie de vésicules pouvant participer activement à la sécrétion régulée des astrocytes (Calegari et al., 1999; Coco et al., 2003; Krzan et al., 2003; Ramamoorthy and Whim, 2008). Les VGluTs et la phogrin (marqueurs des SLMVs et des DCGs respectivement) ne colocalisent pas et les profils de fluorescence des deux types d'organelles sont également très différents, confirmant que les SLMVs et les DCGs constituent bien de deux populations distinctes d'organelles qu'il est facile de distinguer grâce à des marqueurs différents mais également grâce à leur différence de taille. Par ailleurs, la sécrétion des DCGs présente des dynamiques très distinctes de celle des SLMVs permettant de séparer clairement les deux processus.

Après avoir confirmé que les SLMVs glutamatergiques représentaient bien une population homogène et distincte des autres populations d'organelles, nous avons vérifié, dans un second temps, que nos protocoles de chargement ou de marquage permettaient bien un suivi spécifique de cette population.

L'essentiel du chargement de la FM4-64 (90 à 95%) colocalise avec des vésicules exprimant le VGluT-eGFP. Le profil de fluorescence des vésicules chargées avec la FM4-64 est bien similaire à celui des SLMVs et celui des billes de 40nm. La FM4-64 ne colocalise pas avec les marqueurs des DCGs. Néanmoins le chargement de la FM4-64 dans les SLMVs est limité dans le temps : une heure environ après la fin du chargement, sa spécificité est altérée et des compartiments intracellulaires plus gros (représentant probablement les endosomes et les lysosomes) commencent à être chargés à leur tour. Par ailleurs, la spécificité du chargement des SLMVs glutamatergiques par la FM4-64 est activité dépendante. Un chargement de la FM4-64 sans stimulation des GPCRs ne permet pas cette spécificité.

Quant au VGluT1-pHluorin, son expression suite à une transfection transitoire est également spécifique des SLMVs et a été contrôlée de la même façon que les VGluTs endogènes. Les vésicules exprimant le VGluT1-pHluorin expriment également la cellubrevine, contiennent du glutamate, n'expriment pas les marqueurs des autres compartiments intracellulaires et possèdent un profil de fluorescence similaire à celui d'une bille de 40nm.

En conclusion, la caractérisation que nous avons faite des SLMVs glutamatergiques nous permet d'apporter une description assez complète de ces vésicules et de pouvoir, sans équivoque, distinguer ces dernières des autres organelles astrocytaires. Les SLMVs glutamatergiques :

- expriment les VGluTs (les VGluTs endogènes ainsi que les différentes protéines fusions à partir des VGluTs : VGluT2-eGFP, VGluT1-pHluorin et VGluT1-mCherry) ;
- expriment la cellubrevine ;
- contiennent du glutamate ;
- n'expriment pas les marqueurs des lysosomes, du réseau transgolgien, des endosomes précoces ou des DCGs ;
- ont un profil de fluorescence similaire à celui d'une bille fluorescente de 40nm de diamètre ;
- sont chargés par la FM4-64 de façon activité dépendante ;
- fusionnent de manière synchrone et rapide (quelques centaines de millisecondes).

Les SLMVs glutamatergiques représentent donc une population de vésicules homogène et distincte des autres populations d'organelles. Le suivi spécifique de ces vésicules est possible grâce à des constructions contenant les VGluTs et des protéines fluorescentes (VGluT2-eGFP, VGluT1-mCherry ou VGluT1-pHluorin) ou encore en les chargeant avec la FM4-64 suite à une stimulation des GPCRs. Néanmoins, si les constructions VGluTs fluorescentes et la FM4-64 sont des bons rapporteurs des SLMVs, seules les vésicules ayant un profil de fluorescence similaire à celui d'une bille fluorescente de 40nm (et contenant la FM4-64 ou exprimant les VGluTs) peuvent être considérées comme des SLMVs.

3.2. Fusion et recyclage des SLMVs

3.2.1. Modalités de fusion des SLMVs

L'analyse de la sécrétion régulée des SLMVs à l'échelle des vésicules a permis d'obtenir des informations importantes sur les modalités de ce processus. La première est son extrême rapidité, quelques centaines de millisecondes après la stimulation. C'est bien entendu beaucoup plus lent que ce qui est peut être observé pour les neurones mais du même ordre de grandeur que la sécrétion des SLMVs des cellules neurosécrétrices (Kasai, 1999). Cette rapidité est assez surprenante pour des cellules non excitables électriquement (Chow et al., 1994; Chow et al., 1996; Kasai, 1999) dont la sécrétion est, en général, beaucoup plus lente (de l'ordre de quelques secondes) car elle n'est pas couplée à une ouverture des canaux calciques membranaires mais nécessite l'intervention de seconds messagers et la libération du calcium par le RE.

La seconde est que les SLMVs présentent deux modes de fusion : un mode de fusion partielle et un mode de fusion complète. Les SLMVs peuvent fusionner partiellement avec la membrane plasmique tout en conservant leur forme. La fusion dure environ 400ms puis la vésicule se détache de la membrane plasmique. Ce type de fusion est assez similaire au « kiss and run » observé pour les SVs. Les SLMVs peuvent également fusionner avec la membrane plasmique et se fondre complètement dans celle-ci. Ce type de fusion est plus lent et correspond à la fusion totale de la vésicule. La fonctionnalité de ces deux modes de fusion est difficile à définir à ce point de notre étude. Ces deux modes de fusions coexistent au niveau des synapses (Heuser and Reese, 1973; Fesce et al., 1994). La fusion totale permet un relargage massif du contenu de la vésicule mais est coûteuse en énergie et en temps car il faut reformer la vésicule ; le « kiss and run » libère une quantité moins importante du contenu de la vésicule mais permet de réutiliser la vésicule plusieurs fois de suite. Ainsi, dans les terminaisons neuronales, le « kiss and run » permet de soutenir une réponse face à une forte stimulation avec un nombre réduit de vésicules. Il est possible que, pour les astrocytes, ces deux modes de fusions puissent également s'associer pour maintenir la sécrétion régulée selon la nature et l'intensité de la stimulation.

Ces deux modes de fusion impliquent deux populations de SLMVs et soutiennent deux phases distinctes de la sécrétion. Ainsi la stimulation des GPCRs induit-elle une première phase de sécrétion très rapide (0-400ms) impliquant des SLMVs « résidents » (présents dans le champ du TIRF avant la stimulation) et réalisant une fusion de type « kiss and run » puis une seconde phase plus lente (500ms-1.6s) impliquant des SLMVs « new comers » (absents du champ du TIRF avant la stimulation et s'approchant de la membrane durant la stimulation) et réalisant une fusion de type fusion totale. De manière intéressante, ces deux phases de sécrétion sont bien distinctes pour les SLMVs exprimant la pHluorin, par contre la seconde phase de sécrétion est très diminuée pour les SLMVs chargées avec la FM4-64. Cette seconde phase est également absente dans les expériences réalisées avec l'AO (Bezzi et al., 2004; Domercq et al., 2006). Il y a deux hypothèses possibles pour expliquer que la FM4-64 et l'AO ne permettent pas de visualiser cette seconde phase. La première est que cette seconde phase fasse intervenir des vésicules ayant participé à la première phase. Ces vésicules, ayant perdu leur contenu fluorescent lors de la première phase, ne sont plus visibles lors de la

seconde phase. Les «new comers» correspondraient donc aux mêmes vésicules que les «résidents» réalisant une seconde fusion. La seconde hypothèse serait que la seconde phase fasse intervenir des vésicules qui ne sont chargées ni avec la FM4-64 ni avec l'AO. L'absence de la FM4-64 dans ces vésicules signifierait qu'elles n'ont pas fusionné lors du chargement de celle-ci. L'absence de l'AO dans ces vésicules signifierait qu'elles ne sont pas acides lors du chargement de l'AO. Les « new comers » correspondraient donc à des SLMVs nouvellement formées n'ayant pas jamais fusionné précédemment et n'étant pas encore acidifiées, ni donc chargées en glutamate. Des informations supplémentaires sur les modalités de recyclage et de maturation des SLMVs sont nécessaires pour déterminer plus clairement la nature de ces différents pools de SLMVs.

3.2.2. Dynamiques des processus d'exocytose, d'endocytose et de réacidification des SLMVs

Pour étudier les dynamiques des différents processus impliqués dans la sécrétion régulée des SLMVs, nous avons modifié une approche récemment développée pour l'étude du recyclage des SVs neuronales (Sankaranarayanan and Ryan, 2000, 2001; Atluri and Ryan, 2006; Schweizer and Ryan, 2006; Voglmaier et al., 2006) basée sur l'utilisation de la pHluorin. Cette approche consiste à suivre la fluorescence de la pHluorin lors d'une stimulation au niveau d'un bouton synaptique. Lors de la stimulation, la fluorescence émise par la pHluorin au niveau d'un bouton synaptique représente une balance entre l'exocytose (apparition de la fluorescence lorsque la pHluorin est en contact avec le milieu extracellulaire) et la réacidification (disparition de la fluorescence lorsque le pH de la vésicule redevient acide). La séparation des deux processus est ensuite faite grâce à l' « alkaline trapping » avec la Bafilomycine A1 (BafA1) (Sankaranarayanan and Ryan, 2001). En présence de la BafA1, qui est un bloqueur de la réacidification, les vésicules qui fusionnent deviennent fluorescentes et restent fluorescentes car elles ne sont plus réacidifiées ensuite. La fluorescence de la pHluorin, en présence de la BafA1, représente uniquement l'exocytose des vésicules, ce qui permet d'isoler la dynamique de l'exocytose de celle de la réacidification (Sankaranarayanan and Ryan, 2001). La comparaison de la fluorescence de la pHluorin au niveau de boutons synaptiques lors de la stimulation avec et sans la BafA1 permet donc, par différence des deux courbes, de déterminer la dynamique de la réacidification. A cause de l'extrême rapidité du processus de réacidification des vésicules synaptiques suite à leur endocytose lors d'une stimulation (Sankaranarayanan and Ryan, 2000), la dynamique de la réacidification au niveau d'un bouton synaptique donne un accès direct à la dynamique de l'endocytose et la fluorescence de la pHluorin est considérée comme une balance entre l'exocytose et l'endocytose (Sankaranarayanan and Ryan, 2001; Voglmaier et al., 2006).

Pour adapter cette approche à l'étude de la sécrétion régulée des SLMVs des astrocytes, nous avons utilisé le VGluT1-pHluorin pour pouvoir suivre les SLMVs glutamatergique et nous avons utilisé l'épifluorescence pour pouvoir suivre les variations de la fluorescence de la pHluorin sur l'ensemble de la cellule. Néanmoins, comme nous n'avons aucune information sur la vitesse de la réacidification, il nous était impossible de considérer la disparition de la fluorescence de la pHluorin comme un rapporteur de l'endocytose comme c'est le cas pour les boutons synaptiques (Sankaranarayanan and Ryan, 2001; Voglmaier et al., 2006). Il nous fallait donc trouver une façon pour séparer les processus

d'endocytose et de réacidification pour obtenir leurs dynamiques respectives. Pour cela, nous avons utilisé la microscopie TIRF. Si la réacidification a lieu hors du champ du TIRF, alors la fluorescence de la pHluorin, observée en TIRF, est une balance entre l'exocytose (apparition de la fluorescence lorsque la pHluorin est en contact avec le milieu extracellulaire) et l'endocytose ou l'internalisation des vésicules (disparition de la fluorescence lorsque la vésicule fluorescente sort du champ du TIRF). Les courbes de fluorescence de la pHluorin, en TIRF, lors de la stimulation avec et sans la BafA1 sont identiques ce qui confirme que la réacidification n'a pas lieu dans le champ du TIRF. La fluorescence de la pHluorin en TIRF est donc bien une balance de l'exocytose et de l'endocytose.

L'utilisation combinée de la microscopie à épifluorescence et de la microscopie TIRF nous a donc permis de séparer les contributions des trois différents processus (exocytose, endocytose et réacidification) de la façon suivante :

1. Nous avons directement accès à la dynamique de l'exocytose en utilisant la BafA1 et l'épifluorescence. La fluorescence de la pHluorin lors de la stimulation est alors une courbe cumulative de l'exocytose.

2. Pour obtenir la dynamique de la réacidification, il nous faut comparer la fluorescence de la pHluorin lors de la stimulation en présence de BafA1 (exocytose pure) et en son absence (exocytose et réacidification) avec l'épifluorescence. Par soustraction, nous obtenons une courbe cumulative de la réacidification.

3. Pour obtenir la dynamique de l'endocytose, il faut nous comparer la fluorescence de la pHluorin lors de la stimulation en présence de BafA1 avec l'épifluorescence (exocytose pure) et la fluorescence de la pHluorin lors de la stimulation en TIRF (exocytose et endocytose). Par soustraction, nous obtenons une courbe cumulative de l'endocytose.

La dérivée de ces courbes cumulatives nous permet d'obtenir la distribution temporelle des événements d'exocytose, d'endocytose et de réacidification. La dynamique du processus d'exocytose à l'échelle de la cellule est, sans surprise, similaire à celle obtenue par l'analyse à l'échelle des vésicules : rapide et de courte durée. L'exocytose augmente rapidement les premières 800ms après le début de la stimulation puis ralentit pour retourner au niveau basal avant 2s.

Le début de l'endocytose est retardé par rapport à l'exocytose d'environ 400ms ce qui est correspond à la durée moyenne des événements de fusion observés lors de notre analyse à l'échelle des vésicules. Elle est composée de deux phases. La première phase atteint son maximum à 1,2s et la seconde à 2,8s. La première phase correspond probablement à l'internalisation des SLMVs qui ont fusionné par « kiss and run » lors de la première phase d'exocytose et la seconde correspond probablement à la récupération par endocytose des SLMVs qui ont complètement fusionné lors de la seconde phase, bien que des informations complémentaires sur le recyclage des SLMVs seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Il est intéressant de noter que la vitesse de l'endocytose est suffisamment importante ($\text{ratio Endo/Exo} = 0.85$) pour que le recyclage des SLMVs puisse compenser leur exocytose lors de la stimulation (Fernandez-Alfonso and Ryan, 2004).

La dynamique du processus de réacidification est au contraire assez surprenante. On s'attendrait assez logiquement à ce que cette dynamique soit similaire à celles de l'exocytose et de l'endocytose (voire légèrement plus lente) et retardée par rapport à celles-ci du temps nécessaire à la

réacidification des SLMVs. En fait, on observe un phénomène bien différent. La réacidification est également composée de deux phases. Dès le début de la stimulation, il y a une rapide augmentation de la réacidification parallèle à celle de l'exocytose qui atteint également son maximum à 800ms. Cette première phase de réacidification concerne un pool interne de vésicules situé hors du champ du TIRF et qui n'ont pas encore fusionné, ce qui suggère qu'il existe un mécanisme induit par l'activation des GPCRs qui permet de charger en glutamate un nouveau pool de SLMVs pour faire face à une sécrétion soutenue. Cette première phase s'arrête assez rapidement (environ 1.2s). La réacidification des vésicules reste ensuite soutenue pendant une dizaine de secondes. Suite à cela, la réacidification retourne à son niveau basal. La seconde phase représente probablement la réacidification des SLMVs qui ont fusionné puis qui ont été internalisées suite à la stimulation.

En conclusion, l'utilisation de la pHluorin et la combinaison de l'épifluorescence et du TIRF nous ont permis d'obtenir des informations importantes sur les dynamiques des processus d'exocytose, d'endocytose et de recyclage. Nous avons pu confirmer que la stimulation des GPCRs induisait une exocytose rapide. Nous avons pu également mettre en évidence une endocytose et une réacidification rapides, lors de la stimulation, capables de compenser l'épuisement des SLMVs lors de leur fusion. L'endocytose et la réacidification restent soutenues après l'arrêt de la stimulation permettant de préparer la cellule pour la prochaine stimulation. L'existence de mécanismes permettant le renouvellement des SLMVs lors de la stimulation et après celle-ci suggèrent que les astrocytes peuvent faire face à une stimulation soutenue et répétée de leur sécrétion.

Par ailleurs, les dynamiques identifiées dans cette étude pourront être utilisées par la suite pour identifier les différents acteurs moléculaires impliqués dans la libération des gliotransmetteurs en étudiant l'impact de ceux-ci sur ces dynamiques. Cette approche pourra également être adaptée assez facilement à l'étude des autres organelles impliquées dans la sécrétion astrocytaire.

3.3. Couplage stimulus/sécrétion

3.3.1. Microdomaines structuraux formés par le RE, les SLMVs et la membrane plasmique

La rapidité de la fusion des SLMVs suite à la stimulation implique une grande proximité entre le RE et les SLMVs. L'absence de données concernant les propriétés des senseurs du calcium responsables de la fusion et des éléments pouvant limiter la diffusion du calcium dans les astrocytes rend difficile une évaluation théorique de cette distance. Pour autant, au vu des données obtenues dans d'autres cellules sécrétrices, il est raisonnable de penser que cette distance ne peut excéder quelques centaines de nanomètres. Nos observations nous montrent que cette distance est en moyenne de 400nm. Par ailleurs, la très grande proximité entre le RE et la membrane plasmique (<100nm) suggère un arrangement spatial complexe entre ces deux structures délimitant de petits espaces dans lesquels la diffusion des messagers (y compris le calcium) serait limitée et dans lesquels s'intègrent les SLMVs. Il est important de noter que ces données n'ont pas été obtenues dans des conditions morphologiques particulières à proximité du bord des cellules ou dans des prolongements de petite taille par exemple. Il ne s'agit pas d'un rapprochement « contraint » par les

dimensions de la cellule mais d'un rapprochement structurel probablement médié par des protéines de structure (**Figure 19**).

3.3.2. Augmentations calciques rapides, transitoires et localisées contrôlant la sécrétion régulée des SLMVs

Traditionnellement, les études qui ont porté sur l'élévation calcique suite à la stimulation de GPCRs (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Parri et al., 2001; Pasti et al., 2001; Fiacco and McCarthy, 2006) ont caractérisé une augmentation calcique somatique et globale. Les dynamiques de cette augmentation calcique sont trop lentes (1 à 2s pour la stimulation des mGluRs) pour induire la fusion rapide des SLMVs que l'on observe ici. Grâce à la microscopie TIRF, nous avons pu observer les augmentations calciques à proximité de la membrane plasmique. Notre étude montre que la stimulation des mGluR du groupe I induit également des augmentations calciques transitoires rapides (50-150ms) et très localisées (<3 μ m) provenant des réserves calciques internes. La morphologie de ces augmentations calciques est assez similaire à celle des « calcium puffs » (Thomas et al., 2000; Bootman et al., 2001) décrits comme des augmentations de la $[Ca^{2+}]_i$ rapides avec une faible diffusion spatiale (Rizzuto and Pozzan, 2006). Les causes de cette morphologie particulière ne sont pas encore définies. Il est possible qu'elle soit due à un regroupement de récepteurs IP3 du RE et/ou un regroupement des GPCRs sur la membrane plasmique. Il est également assez difficile de définir la relation existant entre ces augmentations calciques transitoires et localisées et l'augmentation calcique globale observée suite à la stimulation. Il a été montré, dans différents types cellulaires, que ces « calcium puffs » pouvaient permettre l'initiation d'une augmentation calcique globale (Bootman et al., 1997; Bootman et al., 2001; Tovey et al., 2001). Nous avons pu observer que, dans certains cas, les augmentations calciques locales pouvaient se propager sur une certaine distance (plusieurs micromètres) le long de la membrane plasmique. Néanmoins, la pénétration limitée du TIRF ne permet pas de définir les relations spatio-temporelles pouvant exister entre ces deux formes d'élévations calciques. Une étude permettant d'observer simultanément les augmentations calciques locales et globales serait nécessaire pour comprendre la relation de l'une à l'autre.

Ces augmentations calciques locales se produisent à proximité (moins de 300nm) des sites de fusion et entre 50 et 100ms avant la fusion suggérant que ces augmentations calciques seraient bien responsables de la fusion des SLMVs. De manière intéressante, la distribution temporelle de ces augmentations calciques locales est quasiment identique à celle des événements de fusion mais la précède d'une centaine de millisecondes confirmant ainsi la corrélation entre ces deux événements.

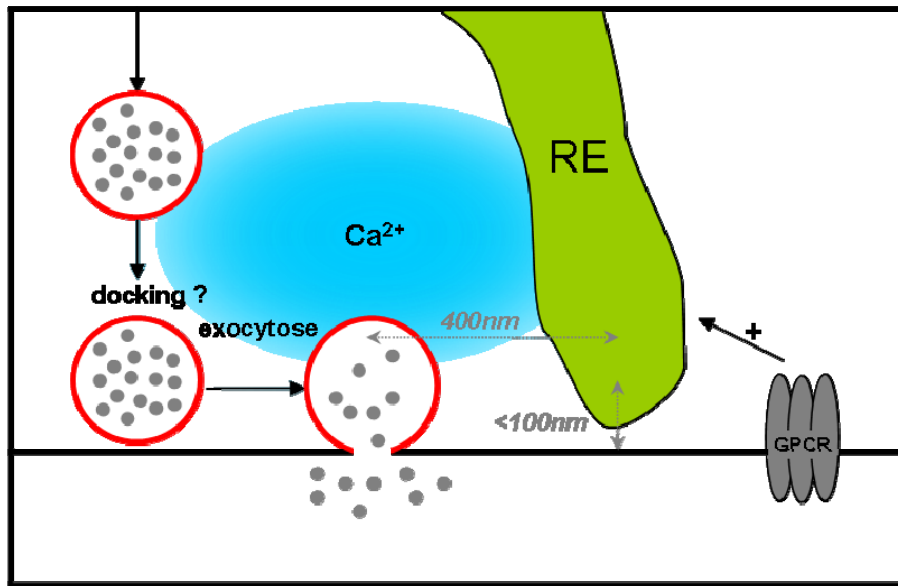


Figure 19. Schéma des micro-domaines structuraux et fonctionnels regroupant le RE, les SLMVs et la membrane plasmique.

La distance moyenne (400nm) entre le RE et les SLMVs et la très grande proximité entre le RE et la membrane plasmique (<100nm) suggère un arrangement spatial complexe entre ces deux structures délimitant de petits espaces dans lesquels la diffusion des messagers (y compris le calcium) serait limitée et dans lesquels s'intègrent les SLMVs. La stimulation des GPCRs induit des augmentations calciques transitoires rapides (50-150ms) et très localisées (<3µm), qui se produisent à proximité (<300nm) des sites de fusion et entre 50 et 100ms avant la fusion suggérant que ces augmentations calciques seraient bien responsables de la fusion des SLMVs.

3.4. Conclusion générale et perspectives

Notre étude offre, à mon sens, un paradigme expérimental intéressant qui, s'il est suivi, peut permettre une description précise et rigoureuse de la sécrétion régulée et contribuer à obtenir une vision cohérente de la gliotransmission. Il est utilisé ici pour l'étude de la libération du glutamate par exocytose régulée des SLMVs glutamatergiques, une population homogène et définie. Il peut également être adapté à d'autres gliotransmetteurs et d'autres types de vésicules de sécrétion pour peu que les différents compartiments présentent des marqueurs moléculaires spécifiques qui puissent être fusionnés à la pHluorin. La caractérisation rigoureuse des différents types d'organelles impliqués dans la sécrétion (taille, expression de marqueurs spécifiques, type de gliotransmetteur libéré), la claire séparation des contributions des différents types d'organelles dans la sécrétion et le suivi spécifique des propriétés de sécrétion de chacun est l'unique façon de comprendre l'impact de la gliotransmission sur le fonctionnement cérébral. Nous avons, dans cette étude, attaché une attention particulière à la caractérisation des SLMVs glutamatergique afin de pouvoir déterminer des critères stricts pour les distinguer clairement des autres organelles et suivre leur sécrétion régulée sans risque d'interférence avec celle d'une autre population de vésicules.

Nous révélons ici une organisation complexe des différents éléments impliqués dans la sécrétion régulée des SLMVs. Cette organisation semble être à la base du couplage rapide entre l'activation des GPCRs et la sécrétion. L'existence de compartiments subcellulaires indépendants formés par le RE, la membrane plasmique et les SLMVs permettant de contenir les messagers intracellulaires et de limiter leur diffusion semble compenser de manière efficace la non-excitabilité

électrique des astrocytes. Par ailleurs, l'existence des différents pools de vésicules recrutés séquentiellement et fusionnant selon des modalités distinctes ainsi que l'existence de mécanismes permettant le renouvellement de ces pools lors de la stimulation suggèrent que les astrocytes peuvent faire face à une stimulation soutenue de leur sécrétion. Ces données suggèrent que la libération de gliotransmetteurs par exocytose régulée n'est pas seulement une propriété des astrocytes en culture mais bien le résultat d'une forte spécialisation de ces cellules pour la sécrétion. La rapidité de cette sécrétion donne aux astrocytes toutes les compétences pour pouvoir intervenir de manière active dans la transmission et l'intégration de l'information. L'existence de SLMVs glutamatergiques dans les terminaisons perisynaptiques des astrocytes *in situ* possédant les mêmes caractéristiques que celles observées *in vitro* (Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007; Bergersen and Gundersen, 2009) suggère l'existence d'une sécrétion régulée du glutamate également dans les astrocytes *in vivo*. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la libération de glutamate par les astrocytes pouvait moduler la transmission synaptique selon différents processus (Araque et al., 1998; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Fiacco and McCarthy, 2004; Liu et al., 2004b; Liu et al., 2004a; Perea and Araque, 2005; Kozlov et al., 2006; D'Ascenzo et al., 2007; Jourdain et al., 2007; Perea and Araque, 2007; Navarrete and Araque, 2008; Shigetomi et al., 2008). Si la libération du glutamate par les astrocytes est essentielle à cette modulation de l'activité synaptique, les modalités de sa libération ne sont toujours pas définies. Certaines études ont néanmoins recueilli des preuves assez fortes mais indirectes en faveur d'une sécrétion régulée du glutamate (Jourdain et al., 2007; Perea and Araque, 2007). Pour autant, il reste encore difficile de définir la participation exacte de la sécrétion régulée des SLMVs dans la transmission et l'intégration de l'information par les astrocytes. Il est donc essentiel de continuer à caractériser les acteurs participant à la sécrétion régulée des SLMVs afin de pouvoir, par la suite, mettre en place de nouvelles stratégies permettant de mettre directement en évidence la sécrétion régulée des SLMVs *in situ* ou *in vivo* et comprendre ses implications dans le fonctionnement cérébral.

Il est, dans un premier temps, indispensable de continuer à caractériser les microdomaines structurels et fonctionnels, que nous avons mis en évidence dans cette étude, pour comprendre de quelle façon ils fonctionnent et comment ils peuvent éventuellement être modifiés lors de conditions physiologiques ou pathologiques. Il est assez vraisemblable que ces microdomaines intègrent également la première partie du couplage stimulus/sécrétion à savoir les GPCRs et la signalisation aval menant à la libération du calcium comme cela a été décrit pour les structures post-synaptiques glutamatergiques (Tse et al., 1997; Blaustein and Golovina, 2001; Sala et al., 2003; Sala et al., 2005; Wu et al., 2006). Aussi envisageons-nous de définir la proximité entre les structures du RE proches de la membrane plasmique avec certaines GPCRs, comme le mGluR5, comme nous l'avons fait ici pour le RE et les SLMVs. L'implication de la protéine Homer1b dans la mise en place et le maintien de ces microdomaines a été montrée dans les épines dendritiques (Tu et al., 1998; Xiao et al., 1998; Sala et al., 2003; Sala et al., 2005). Les protéines Homer sont des scaffold protéines qui se lient à différentes protéines impliquées dans la signalisation calcique au sein des microdomaines dans les cellules excitables et non excitables (Worley et al., 2007). Parmi cette famille de protéine, Homer1 se lie

particulièrement aux récepteurs du glutamate mGluRs du groupe I. Les formes longues (Homer1b et Homer1c) se lient également aux récepteurs à l'IP₃ présent sur le RE permettant la formation de complexes macromoléculaire qui permettent une libération efficace du calcium (Nakanishi, 1994; Tu et al., 1999; Xiao et al., 2000) et soutiennent la transduction des stimuli excitateurs au niveau des épines dendritiques (Fagni et al., 2000). Au contraire, la forme courte (Homer1a) fonctionne comme un dominant négatif qui inhibe l'interaction de Homer1b/c avec les mGluRs et les récepteurs IP₃ rompant ainsi le lien physique entre la membrane plasmique et le RE et diminuant la libération de calcium induite par le glutamate au niveau des synapses excitatrices (Xiao et al., 2000; Sala et al., 2005; Tappe et al., 2006).

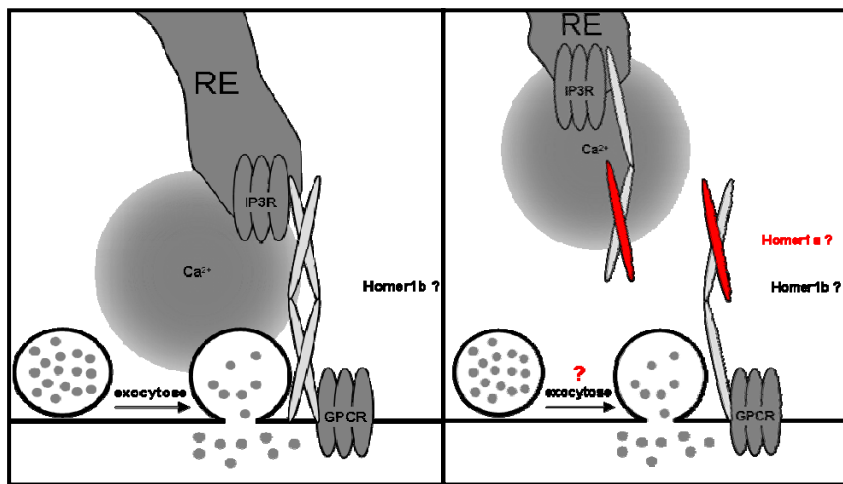


Figure 20.

Hypothèse du rôle des protéines Homer1b et Homer1a sur les microdomaines calciques et la sécrétion régulée des astrocytes.

Homer1b permet de créer et de maintenir un lien physique entre la membrane plasmique et le RE permettant aux GPCRs d'induire des augmentations calciques sous-membranaires contrôlant la sécrétion régulée des SLMVs ; son dominant négatif Homer1a empêche ce lien perturbant ainsi le couplage stimulus/sécrétion.

L'expression de Homer1a est rapidement induite dans les neurones suite à différentes conditions de stress (Miyabe et al., 2006; Tappe et al., 2006; Maret et al., 2007) permettant ainsi, en limitant la libération de calcium induite par le glutamate, de protéger les synapses excitatrices. Dans les astrocytes, ces protéines sont exprimées et interagissent avec différents récepteurs membranaires ainsi qu'avec les récepteurs IP₃ (Dziedzic et al., 2003; Foa et al., 2005; Weerth et al., 2007). Le rôle de Homer 1 dans les astrocytes n'a jamais été étudié mais il est probable qu'il puisse interagir dans le maintien des microdomaines et intervenir dans l'efficacité du couplage stimulus/sécrétion. La surexpression de Homer1a dans les astrocytes nous permettra de comprendre dans quelle mesure ce dominant négatif affecte l'organisation particulière du RE, des SLMVs et de la membrane plasmique (**Figure 20**). Si, comme il est probable, Homer1a perturbe la formation des microdomaines, il sera possible de déterminer l'importance de cette organisation structurale dans la sécrétion régulée des astrocytes.

Dans un second temps, il sera indispensable d'obtenir de plus amples informations sur la nature de des différents pools de SLMVs (« new comers » vs « résidents »), leur implication exacte

dans la sécrétion ainsi que la caractérisation des étapes de priming/docking. L'étude de la sécrétion régulée des astrocytes souffre de notre faible connaissance des acteurs moléculaires impliqués dans ces processus. Cette étude pourra servir de base pour identifier certains de ces acteurs moléculaires et comprendre leur implication dans les différentes étapes de la sécrétion régulée. Il est difficile de prédire quels peuvent être ces acteurs moléculaires. Une des molécule ayant été fortement impliquée dans la modulation de la sécrétion régulée du glutamate est la cytokine $TNF\alpha$ (Bezzi et al., 2001; Rossi et al., 2005; Domercq et al., 2006). Le $TNF\alpha$ via son récepteur TNFR1 exerce un contrôle sur la sécrétion régulée de glutamate par les astrocytes en culture (Domercq et al., 2006). La libération de glutamate par sécrétion régulée est diminuée d'environ 25% (Bezzi et al., 1998) dans les cultures d'astrocytes lorsque la signalisation induite par le $TNF\alpha$ est absente (bloquée pharmacologiquement ou supprimée génétiquement). Pour le moment, le mécanisme par lequel le $TNF\alpha$ peut modifier la sécrétion régulée des astrocytes reste inconnu. De manière intéressante, il a été montré récemment que le TNFR1 (récepteur du $TNF\alpha$) pouvait interagir avec une Rab3GED (DENN/MADD) et moduler ainsi la formation, les transports ainsi que le docking des SVs au niveau des synapses (Miyoshi and Takai, 2004). Les astrocytes expriment DENN/MADD et une diminution de son expression a été associée à une altération de la sécrétion régulée de glutamate (Rossi et al., 2005). Ces résultats indiquent que la signalisation entre l'activation des GPCRs et la sécrétion régulée de glutamate est sensible au niveau extracellulaire de $TNF\alpha$ impliquant très probablement une signalisation intracellulaire induite par le TNFR1 et modulant l'action de DENN/MADD sur le recyclage de Rab3 (**Figure 21**). Dans quelle mesure, cette réduction de l'expression de DENN/MADD altère la capacité des SLMVs à fusionner n'a pas encore été déterminée.

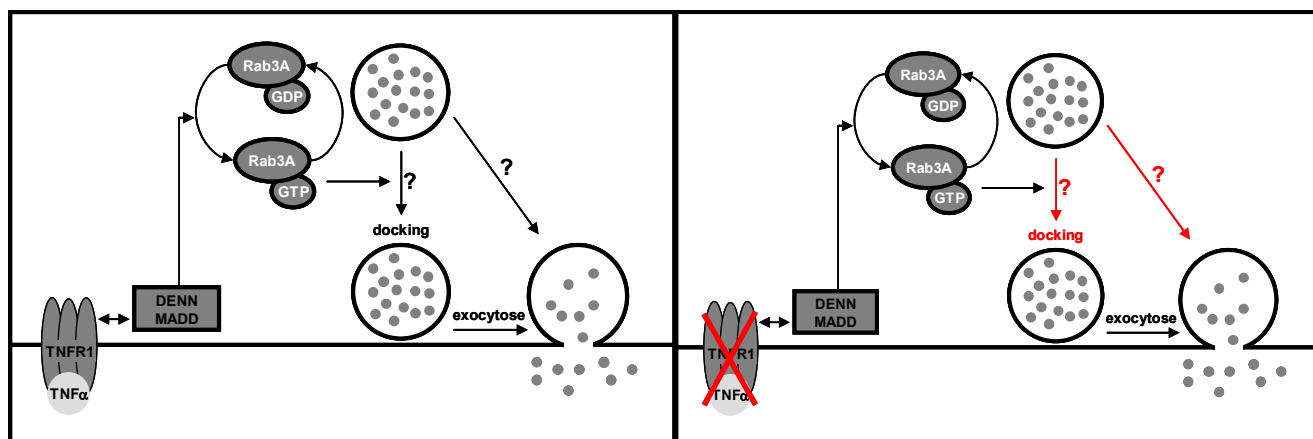


Figure 21.

Influence de l'activation du récepteur TNFR1 sur la libération de neurotransmetteurs.

Dans les neurones, le récepteur TNFR1, qui est le récepteur de la forme soluble du $TNF\alpha$, est fortement associé à une protéine, DENN/MADD ou Rab3GEP, qui favorise le recyclage de Rab3A en association avec d'autres protéines (comme Rab3GAP, Rabconnection ou RabGDI). Le recyclage de Rab3A est essentiel à la formation et au transport des vésicules synaptiques ainsi qu'aux étapes de docking de la neurotransmission.

Il est intéressant de noter que nous avons, avec Homer1 et le $TNF\alpha$, deux acteurs potentiels qui pourraient influencer sur la sécrétion régulée soit en modifiant le couplage stimulus/sécrétion (pour Homer1) soit en modifiant la capacité des SLMVs à fusionner (pour le $TNF\alpha$). Un couplage rapide stimulus/sécrétion ainsi que la capacité des vésicules à fusionner sont deux compétences critiques pour une intégration rapide et efficace de l'information. Dans les neurones, ces compétences sont séparées dans l'espace, le couplage stimulus/sécrétion est un problème post-synaptique alors que la capacité des SVs à fusionner est un problème présynaptique. Pour les astrocytes, ces deux compétences semblent réunies au même endroit dans des microdomaines structuraux et fonctionnels dont l'organisation semble bien plus complexe que les études précédentes pouvaient le laisser imaginer. Le $TNF\alpha$ comme Homer1 étant impliqués dans différentes conditions pathologiques (addictions, troubles psychiatriques, inflammations, ischémie, maladies neurodégénératives, etc.), il semble de la perturbation de la sécrétion régulée des astrocytes via l'altération de ces microdomaines puisse être un des facteurs cruciaux de la mise en place et de l'évolution des conditions pathologiques.

La poursuite de l'identification des composants de ces microdomaines dans les astrocytes et leur influence sur la sécrétion régulée des astrocytes en culture permettra de faciliter l'investigation subséquente de leur existence *in situ* ou *in vivo*, de développer des stratégies plus fines pour modifier spécifiquement la sécrétion astrocytaire *in situ* et *in vivo* et en comprendre l'implication dans le fonctionnement cérébral.

4. ANNEXES

4.1. Publications

- Cali C., **Marchaland J.**, Mirante O., Bezzi P. Chemokines as neuromodulators: regulation of glutamatergic transmission by CXCR4-mediated glutamate release from astrocytes. In Chemokine Receptors and NeuroAIDS. Meucci, Olimpia (Ed.) 2010
- Cali C., **Marchaland J.**, Spagnuolo P., Gremion J., Bezzi P. Regulated exocytosis from astrocytes physiological and pathological related aspects. *Int Rev Neurobiol.* 2009 ; 85:261-93.
- Marchaland J.**, Cali C., Voglmaier S.M., Li H., Regazzi R., Edwards R.H., Bezzi P. Fast subplasma membrane Ca²⁺ transients control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes. *J Neurosci.* 2008 ; 28:9122-32.
- Cali C., **Marchaland J.**, Regazzi R., Bezzi P. SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J Neuroimmunol.* 2008; 198:82-91.
- Domercq, M., Brambilla L., Pilati E., **Marchaland J.**, Volterra A., Bezzi P. P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: Control by TNFalpha and prostaglandins. *J Biol Chem.* 2006.

4.2. Posters et participation aux congrés

- "Calcium microdomains control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes" (**J. Marchaland**, C. Cali, S.M. Voglmaier, H. Li, R. Regazzi, R. H. Edwards and P. Bezzi)
9th european meeting on glial cells in health and disease, September 2009, Paris (France).
- 6th FENS Forum of European Neurosciences**, July 2008, Geneva (Switzerland).
- International Meeting "Mechanism(s) of Exocytosis 2008" and "15th Young Neuroscientists Meeting"**, May 2008, Ljubljana (Slovenia).
- 5th Annual Meeting of the Lemanic Neuroscience Programs**, September 2008, Les Diablerets.
- "Sub-membrane Ca²⁺ domains in astrocytes" (**J. Marchaland**, C. Cali, S.M. Voglmaier, H. Li, R. Regazzi, R. H. Edwards and P. Bezzi)
Changins "Neuroscience", Novembre 2007, Nyon (Switzerland).
- 4th Annual Meeting of the Lemanic Neuroscience Programs**, September 2007, Les Diablerets.
- "Imaging exocytosis of glutamatergic vesicles in astrocytes with FM 4-64 dye and TIRF microscopy" (**J. Marchaland**, H. Stubbe and P. Bezzi).
3rd Annual Meeting of the Lemanic Neuroscience Programs, September 2006, Les Diablerets.

5. RÉFÉRENCES

- Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G, Lindau M (1997) The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 389:509-512.
- Allen JW, Shanker G, Aschner M (2001) Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res* 894:131-140.
- Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A (2004) Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9745-9750.
- Andrews NW (2000) Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol* 10:316-321.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.
- Anlauf E, Derouiche A (2005) Astrocytic exocytosis vesicles and glutamate: a high-resolution immunofluorescence study. *Glia* 49:96-106.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822-6829.
- Aravanis AM, Pyle JL, Tsien RW (2003) Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* 423:643-647.
- Atluri PP, Ryan TA (2006) The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals. *J Neurosci* 26:2313-2320.
- Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133-1145.
- Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11:401-407.
- Avery J, Ellis DJ, Lang T, Holroyd P, Riedel D, Henderson RM, Edwardson JM, Jahn R (2000) A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells. *J Cell Biol* 148:317-324.
- Baker DA, Shen H, Kalivas PW (2002) Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. *Amino Acids* 23:161-162.
- Bass NH, Hess HH, Pope A, Thalheimer C (1971) Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 143:481-490.
- Bender AS, Reichelt W, Norenberg MD (2000) Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 37:269-276.
- Bergami M, Santi S, Formaggio E, Cagnoli C, Verderio C, Blum R, Berninger B, Matteoli M, Canossa M (2008) Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J Cell Biol* 183:213-221.
- Bergersen LH, Gundersen V (2009) Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience* 158:260-265.
- Bergles DE, Jahr CE (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7709-7716.
- Betz WJ, Bewick GS (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255:200-203.

RÉFÉRENCES

- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613-620.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702-710.
- Blaustein MP, Golovina VA (2001) Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores. *Trends Neurosci* 24:602-608.
- Blum AE, Joseph SM, Przybylski RJ, Dubyak GR (2008) Rho-family GTPases modulate Ca²⁺-dependent ATP release from astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C231-241.
- Bootman M, Niggli E, Berridge M, Lipp P (1997) Imaging the hierarchical Ca²⁺ signalling system in HeLa cells. *J Physiol* 499 (Pt 2) :307-314.
- Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ (2001) The organisation and functions of local Ca²⁺ signals. *J Cell Sci* 114:2213-2222.
- Bowser DN, Khakh BS (2007) Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4212-4217.
- Broer A, Deitmer JW, Broer S (2004) Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia* 48:298-310.
- Brookes N (2005) *Mechanisms of Solute Transport in Glia*. : Oxford university press, Oxford.
- Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK, Betz WJ (2004) Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods* 33:287-294.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 22:73-86.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
- Calegari F, Coco S, Taverna E, Bassetti M, Verderio C, Corradi N, Matteoli M, Rosa P (1999) A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J Biol Chem* 274:22539-22547.
- Cali C, Marchaland J, Regazzi R, Bezzi P (2008) SDF 1- α (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J Neuroimmunol* 198:82-91.
- Cali C, Marchaland J, Spagnuolo P, Gremion J, Bezzi P (2009) Regulated exocytosis from astrocytes: physiological and pathological related aspects. *Int Rev Neurobiol* 85:261-293.
- Chao TI, Rickman M, Wolff JR, eds (2002) *The synapse-astrocyte boundary : an anatomical basis for an integrative role of glia in synaptic transmission*. Oxford Univ. Press, Oxford UK
- Chen X, Wang L, Zhou Y, Zheng LH, Zhou Z (2005) "Kiss-and-run" glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 25:9236-9243.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Chow RH, Klingauf J, Neher E (1994) Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12765-12769.
- Chow RH, Klingauf J, Heinemann C, Zucker RS, Neher E (1996) Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells. *Neuron* 16:369-376.

RÉFÉRENCES

- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278:1354-1362.
- Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, He L, Liu Y, Nedergaard M (1998) Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J Neurosci* 18:2520-2537.
- Crippa D, Schenk U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, Pozzan T, Matteoli M, Carmignoto G (2006) Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol* 570:567-582.
- D'Ascenzo M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Auberson YP, Moss SJ, Haydon PG (2007) mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1995-2000.
- Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18:2475-2485.
- Dewey WL (1986) Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 38:151-178.
- Domercq M, Brambilla L, Pilati E, Marchaland J, Volterra A, Bezzi P (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J Biol Chem* 281:30684-30696.
- Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 19:10193-10200.
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23:1320-1328.
- Dziedzic B, Prevot V, Lomniczi A, Jung H, Cornea A, Ojeda SR (2003) Neuron-to-glia signaling mediated by excitatory amino acid receptors regulates ErbB receptor function in astroglial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci* 23:915-926.
- Eliasson L, Renstrom E, Ding WG, Proks P, Rorsman P (1997) Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca²⁺-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 503 (Pt 2) :399-412.
- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23:80-88.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.
- Fernandez-Alfonso T, Ryan TA (2004) The kinetics of synaptic vesicle pool depletion at CNS synaptic terminals. *Neuron* 41:943-953.
- Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J (1994) Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol* 4:1-4.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722-732.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2006) Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54:676-690.
- Fields RD, Stevens B (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci* 23:625-633.
- Foa L, Jensen K, Rajan I, Bronson K, Gasperini R, Worley PF, Tu JC, Cline HT (2005) Homer expression in the *Xenopus* tadpole nervous system. *J Comp Neurol* 487:42-53.

RÉFÉRENCES

- Fujita T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009) P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* 57:244-257.
- Gaffield MA, Betz WJ (2006) Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protoc* 1:2916-2921.
- Gerber SH, Sudhof TC (2002) Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51 Suppl 1:S3-11.
- Gitler D, Takagishi Y, Feng J, Ren Y, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Greengard P, Augustine GJ (2004) Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 24:11368-11380.
- Golgi C (1898) On the structure of nerve cells. 1898. *J Microsc* 155:3-7.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA (2007) Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55:1214-1221.
- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA (2008) Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456:745-749.
- Grass D, Pawlowski PG, Hirrlinger J, Papadopoulos N, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsman S (2004) Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J Neurosci* 24:1358-1365.
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68:138-149.
- Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139-143.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27:6473-6477.
- Hallermayer K, Harmening C, Hamprecht B (1981) Cellular localization and regulation of glutamine synthetase in primary cultures of brain cells from newborn mice. *J Neurochem* 37:43-52.
- Harata N, Pyle JL, Aravanis AM, Mozhayeva M, Kavalali ET, Tsien RW (2001) Limited numbers of recycling vesicles in small CNS nerve terminals: implications for neural signaling and vesicular cycling. *Trends Neurosci* 24:637-643.
- Haskew-Layton RE, Rudkouskaya A, Jin Y, Feustel PJ, Kimelberg HK, Mongin AA (2008) Two distinct modes of hypoosmotic medium-induced release of excitatory amino acids and taurine in the rat brain in vivo. *PLoS ONE* 3:e3543.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G (1994) Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371:513-515.
- Heinemann C, Chow RH, Neher E, Zucker RS (1994) Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺. *Biophys J* 67:2546-2557.
- Hepp R, Perraut M, Chasserot-Golaz S, Galli T, Aunis D, Langley K, Grant NJ (1999) Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia* 27:181-187.
- Hertz L (1979) Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog Neurobiol* 13:277-323.
- Hertz L (2004) Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int* 45:285-296.
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315-344.
- Hussy N, Deleuze C, Desarmenien MG, Moos FC (2000) Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol* 62:113-134.

RÉFÉRENCES

- Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369-1376.
- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631-643.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
- Jaiswal JK, Fix M, Takano T, Nedergaard M, Simon SM (2007) Resolving vesicle fusion from lysis to monitor calcium-triggered lysosomal exocytosis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14151-14156.
- Jeftinija SD, Jeftinija KV, Stefanovic G (1997) Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release. *Brain Res* 750:41-47.
- Jeremic A, Jeftinija K, Stevanovic J, Glavaski A, Jeftinija S (2001) ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J Neurochem* 77:664-675.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331-339.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28:4702-4711.
- Kang N, Xu J, Xu Q, Nedergaard M, Kang J (2005) Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 94:4121-4130.
- Kasai H (1999) Comparative biology of Ca²⁺-dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function. *Trends Neurosci* 22:88-93.
- Kasai H, Kishimoto T, Liu TT, Miyashita Y, Podini P, Grohovaz F, Meldolesi J (1999) Multiple and diverse forms of regulated exocytosis in wild-type and defective PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:945-949.
- Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW (2004) Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305:99-103.
- Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10:1583-1591.
- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10058-10063.
- Kreft M, Stenovec M, Rupnik M, Grilc S, Krzan M, Potokar M, Pangrsic T, Haydon PG, Zorec R (2004) Properties of Ca²⁺-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia* 46:437-445.
- Krzan M, Stenovec M, Kreft M, Pangrsic T, Grilc S, Haydon PG, Zorec R (2003) Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *J Neurosci* 23:1580-1583.
- Kukley M, Barden JA, Steinhauser C, Jabs R (2001) Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36:11-21.
- Laughlin SB (2001) Energy as a constraint on the coding and processing of sensory information. *Curr Opin Neurobiol* 11:475-480.
- Li D, Ropert N, Koulakoff A, Giaume C, Oheim M (2008) Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca²⁺-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J Neurosci* 28:7648-7658.
- Liu HT, Toychiev AH, Takahashi N, Sabirov RZ, Okada Y (2008) Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res* 18:558-565.

RÉFÉRENCES

- Liu QS, Xu Q, Kang J, Nedergaard M (2004a) Astrocyte activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors modulates hippocampal inhibitory synaptic transmission. *Neuron Glia Biol* 1:307-316.
- Liu QS, Xu Q, Arcuino G, Kang J, Nedergaard M (2004b) Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3172-3177.
- Llona I (1995) Synaptic like microvesicles: do they participate in regulated exocytosis? *Neurochem Int* 27:219-226.
- Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23:7337-7342.
- Longuemare MC, Swanson RA (1997) Net glutamate release from astrocytes is not induced by extracellular potassium concentrations attainable in brain. *J Neurochem* 69:879-882.
- Loo DT, Althoen MC, Cotman CW (1995) Differentiation of serum-free mouse embryo cells into astrocytes is accompanied by induction of glutamine synthetase activity. *J Neurosci Res* 42:184-191.
- MacDonald PE, Obermuller S, Vikman J, Galvanovskis J, Rorsman P, Eliasson L (2005) Regulated exocytosis and kiss-and-run of synaptic-like microvesicles in INS-1 and primary rat beta-cells. *Diabetes* 54:736-743.
- Mackenzie B, Erickson JD (2004) Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch* 447:784-795.
- Madison DL, Kruger WH, Kim T, Pfeiffer SE (1996) Differential expression of rab3 isoforms in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res* 45:258-268.
- Magistretti P, Chatton J-Y, Pellerin L, eds (2002) The role of astrocytes in coupling synaptic activity to glucose utilization. Oxford Univ. Press, Oxford UK
- Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209:2304-2311.
- Magistretti PJ, Pellerin L (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1155-1163.
- Maienschein V, Marxen M, Volkandt W, Zimmermann H (1999) A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* 26:233-244.
- Malarkey EB, Parpura V (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52:142-154.
- Maret S, Dorsaz S, Gurcel L, Pradervand S, Petit B, Pfister C, Hagenbuchle O, O'Hara BF, Franken P, Tafti M (2007) Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20090-20095.
- Martin DL (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5:81-94.
- Martin TF (2003) Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes. *Biochim Biophys Acta* 1641:157-165.
- Martineau M, Galli T, Baux G, Mothet JP (2008) Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine-mediated gliotransmission. *Glia* 56:1271-1284.
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhauser C (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 23:1750-1758.
- Medhora M, Harder D (1998) Functional role of epoxyeicosatrienoic acids and their production in astrocytes: approaches for gene transfer and therapy (review). *Int J Mol Med* 2:661-669.
- Meldolesi J, Chierigatti E, Luisa Malosio M (2004) Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends Cell Biol* 14:13-19.
- Miyabe T, Miletic G, Miletic V (2006) Loose ligation of the sciatic nerve in rats elicits transient up-regulation of Homer1a gene expression in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 398:296-299.

RÉFÉRENCES

- Miyoshi J, Takai Y (2004) Dual role of DENN/MADD (Rab3GEP) in neurotransmission and neuroprotection. *Trends Mol Med* 10:476-480.
- Mongin AA, Kimelberg HK (2002) ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C569-578.
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 24:2633-2642.
- Moran MM, Melendez R, Baker D, Kalivas PW, Seamans JK (2003) Cystine/glutamate antiporter regulation of vesicular glutamate release. *Ann N Y Acad Sci* 1003:445-447.
- Moran MM, McFarland K, Melendez RI, Kalivas PW, Seamans JK (2005) Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. *J Neurosci* 25:6389-6393.
- Morgenthaler FD, Kraftsik R, Catsicas S, Magistretti PJ, Chatton JY (2006) Glucose and lactate are equally effective in energizing activity-dependent synaptic vesicle turnover in purified cortical neurons. *Neuroscience* 141:157-165.
- Moriyama Y, Yamamoto A, Yamada H, Tashiro Y, Futai M (1996) Role of endocrine cell microvesicles in intercellular chemical transduction. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377:155-165.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5606-5611.
- Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
- Munir M, Correale DM, Robinson MB (2000) Substrate-induced up-regulation of Na⁺-dependent glutamate transport activity. *Neurochem Int* 37:147-162.
- Nadrigny F, Li D, Kemnitz K, Ropert N, Koulakoff A, Rudolph S, Vitali M, Giaume C, Kirchhoff F, Oheim M (2007) Systematic colocalization errors between acridine orange and EGFP in astrocyte vesicular organelles. *Biophys J* 93:969-980.
- Nakanishi S (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13:1031-1037.
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57:883-893.
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3:748-755.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Neher E, Zucker RS (1993) Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10:21-30.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29:547-553.
- Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M (2008) Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci* 28:3264-3276.
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29:3276-3287.

RÉFÉRENCES

- Oheim M, Kirchhoff F, Stuhmer W (2006) Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 40:423-439.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923-926.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Pangrsic T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, Pryazhnikov E, Khiroug L, Giniatullin R, Zorec R (2007) Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem* 282:28749-28758.
- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52:817-830.
- Parpura V, Fang Y, Basarsky T, Jahn R, Haydon PG (1995) Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett* 377:489-492.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jefitnija K, Jefitnija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4:803-812.
- Parsons TD, Coorssen JR, Horstmann H, Almers W (1995) Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* 15:1085-1096.
- Pascual M, Climent E, Guerri C (2001) BDNF induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. *Neuroreport* 12:2673-2677.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17:7817-7830.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21:477-484.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1997) Glutamate uptake stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *J Neurochem* 69:2132-2137.
- Perea G, Araque A (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25:2192-2203.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Pierre K, Pellerin L (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 94:1-14.
- Piet R, Jahr CE (2007) Glutamatergic and purinergic receptor-mediated calcium transients in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 27:4027-4035.
- Poitry-Yamate CL, Vutskits L, Rauen T (2002) Neuronal-induced and glutamate-dependent activation of glial glutamate transporter function. *J Neurochem* 82:987-997.
- Porras OH, Loaiza A, Barros LF (2004) Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:9669-9673.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073-5081.

RÉFÉRENCES

- Pryazhnikov E, Khiroug L (2008) Sub-micromolar increase in $[Ca^{2+}]_i$ triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia* 56:38-49.
- Ramamoorthy P, Whim MD (2008) Trafficking and fusion of neuropeptide Y-containing dense-core granules in astrocytes. *J Neurosci* 28:13815-13827.
- Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M (1998) High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* 291:19-31.
- Re DB, Nafia I, Melon C, Shimamoto K, Kerkerian-Le Goff L, Had-Aissouni L (2006) Glutamate leakage from a compartmentalized intracellular metabolic pool and activation of the lipoxygenase pathway mediate oxidative astrocyte death by reversed glutamate transport. *Glia* 54:47-57.
- Reddy A, Caler EV, Andrews NW (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106:157-169.
- Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86:369-408.
- Robinson MB, Dowd LA (1997) Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv Pharmacol* 37:69-115.
- Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Crugnola A, Giaccone G, Capobianco R, Mangieri M, Kingston AE, Bloc A, Bezzi P, Volterra A (2005) Defective tumor necrosis factor- α -dependent control of astrocyte glutamate release in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:42088-42096.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Rusakov DA, Kullmann DM (1998) Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J Neurosci* 18:3158-3170.
- Rusakov DA, Lehre KP (2002) Perisynaptic asymmetry of glia: new insights into glutamate signalling. *Trends Neurosci* 25:492-494.
- Ryan TA, Reuter H, Smith SJ (1997) Optical detection of a quantal presynaptic membrane turnover. *Nature* 388:478-482.
- Ryan TA, Reuter H, Wendland B, Schweizer FE, Tsien RW, Smith SJ (1993) The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron* 11:713-724.
- Sala C, Roussignol G, Meldolesi J, Fagni L (2005) Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca^{2+} homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci* 25:4587-4592.
- Sala C, Futai K, Yamamoto K, Worley PF, Hayashi Y, Sheng M (2003) Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. *J Neurosci* 23:6327-6337.
- Sankaranarayanan S, Ryan TA (2000) Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol* 2:197-204.
- Sankaranarayanan S, Ryan TA (2001) Calcium accelerates endocytosis of vSNAREs at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 4:129-136.

RÉFÉRENCES

- Sanzgiri RP, Araque A, Haydon PG (1999) Prostaglandin E (2) stimulates glutamate receptor-dependent astrocyte neuromodulation in cultured hippocampal cells. *J Neurobiol* 41:221-229.
- Schweizer FE, Ryan TA (2006) The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 16:298-304.
- Shanker G, Aschner M (2001) Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. *J Neurosci Res* 66:998-1002.
- Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS (2008) Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J Neurosci* 28:6659-6663.
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003) Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 23:9254-9262.
- Snyder SH, Ferris CD (2000) Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am J Psychiatry* 157:1738-1751.
- Sonneward U, Westergaard N, Schousboe A (1997) Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21:56-63.
- Steyer JA, Almers W (2001) A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:268-275.
- Steyer JA, Horstmann H, Almers W (1997) Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388:474-478.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277:10482-10488.
- Striedinger K, Meda P, Scemes E (2007) Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca²⁺ oscillations and cell migration. *Glia* 55:652-662.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348:443-446.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9:260-267.
- Takano T, Kang J, Jaiswal JK, Simon SM, Lin JH, Yu Y, Li Y, Yang J, Dienel G, Zielke HR, Nedergaard M (2005) Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16466-16471.
- Tang XC, Kalivas PW (2003) Bidirectional modulation of cystine/glutamate exchanger activity in cultured cortical astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1003:472-475.
- Tappe A, Klugmann M, Luo C, Hirlinger D, Agarwal N, Benrath J, Ehrenguber MU, During MJ, Kuner R (2006) Synaptic scaffolding protein Homer1a protects against chronic inflammatory pain. *Nat Med* 12:677-681.
- Taraska JW, Perrais D, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S, Almers W (2003) Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2070-2075.
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348:1134-1149.

RÉFÉRENCES

- Theodosios DT, Poulain DA, Oliet SH (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 88:983-1008.
- Thomas-Reetz AC, De Camilli P (1994) A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic beta cells and from chromaffin cells. *Faseb J* 8:209-216.
- Thomas D, Lipp P, Tovey SC, Berridge MJ, Li W, Tsien RY, Bootman MD (2000) Microscopic properties of elementary Ca²⁺ release sites in non-excitable cells. *Curr Biol* 10:8-15.
- Tovey SC, de Smet P, Lipp P, Thomas D, Young KW, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB, Berridge MJ, Thuring J, Holmes A, Bootman MD (2001) Calcium puffs are generic InsP₃-activated elementary calcium signals and are downregulated by prolonged hormonal stimulation to inhibit cellular calcium responses. *J Cell Sci* 114:3979-3989.
- Trajkovic K, Dhaunchak AS, Goncalves JT, Wenzel D, Schneider A, Bunt G, Nave KA, Simons M (2006) Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol* 172:937-948.
- Tse FW, Tse A, Hille B, Horstmann H, Almers W (1997) Local Ca²⁺ release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron* 18:121-132.
- Tsuboi T, Zhao C, Terakawa S, Rutter GA (2000) Simultaneous evanescent wave imaging of insulin vesicle membrane and cargo during a single exocytotic event. *Curr Biol* 10:1307-1310.
- Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP₃ receptors. *Neuron* 21:717-726.
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23:583-592.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.
- Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A (2007) Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 82:57-71.
- Voets T, Neher E, Moser T (1999) Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23:607-615.
- Voglmaier SM, Kam K, Yang H, Fortin DL, Hua Z, Nicoll RA, Edwards RH (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron* 51:71-84.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Volterra A, Bezzi P, Rizzini BL, Trotti D, Ullensvang K, Danbolt NC, Racagni G (1996) The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur J Neurosci* 8:2019-2028.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-286.
- Weerth SH, Holtzclaw LA, Russell JT (2007) Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca²⁺ wave propagation in glial cells. *Cell Calcium* 41:155-167.
- Winship IR, Plaa N, Murphy TH (2007) Rapid astrocyte calcium signals correlate with neuronal activity and onset of the hemodynamic response in vivo. *J Neurosci* 27:6268-6272.

RÉFÉRENCES

- Worley PF, Zeng W, Huang G, Kim JY, Shin DM, Kim MS, Yuan JP, Kiselyov K, Muallem S (2007) Homer proteins in Ca²⁺ signaling by excitable and non-excitable cells. *Cell Calcium* 42:363-371.
- Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS (2006) Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 174:803-813.
- Xiao B, Tu JC, Worley PF (2000) Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr Opin Neurobiol* 10:370-374.
- Xiao B, Tu JC, Petralia RS, Yuan JP, Doan A, Breder CD, Ruggiero A, Lanahan AA, Wenthold RJ, Worley PF (1998) Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21:707-716.
- Xu J, Peng H, Kang N, Zhao Z, Lin JH, Stanton PK, Kang J (2007) Glutamate-induced exocytosis of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 282:24185-24197.
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 23:3588-3596.
- Zenisek D, Steyer JA, Almers W (2000) Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406:849-854.
- Zenisek D, Steyer JA, Feldman ME, Almers W (2002) A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron* 35:1085-1097.
- Zhang Q, Fukuda M, Van Bockstaele E, Pascual O, Haydon PG (2004a) Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9441-9446.
- Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M, Krzan M, Li N, Sul JY, Halassa M, Van Bockstaele E, Zorec R, Haydon PG (2004b) Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 279:12724-12733.
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9:945-953.
- Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G (2003a) Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol* 553:407-414.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003b) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.