



**HAL**  
open science

# Stabilisation des synapses glutamatergiques de l'hippocampe par la signalisation adénoenergique impliquant des interactions neurogliales

Claire Montmasson

► **To cite this version:**

Claire Montmasson. Stabilisation des synapses glutamatergiques de l'hippocampe par la signalisation adénoenergique impliquant des interactions neurogliales. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS024 . tel-03974288

**HAL Id: tel-03974288**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-03974288v1>**

Submitted on 21 Nov 2024

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

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

## UNIVERSITE DE LILLE

Ecole doctorale Biologie Santé (EDBSL)

Institut du Fer à Moulin – *Equipe Plasticité des Réseaux Corticaux et Epilepsie*

Lille Neuroscience & Cognition – *Equipe Alzheimer et Tauopathies*

Thèse de doctorat en Neurosciences

# **Stabilisation des synapses glutamatergiques de l'hippocampe par la signalisation adénosinergique impliquant des interactions neurogliales**

Par Claire MONTMASSON

Co-dirigée par Sabine LEVI et David BLUM

Présentée et soutenue publiquement le 4 octobre 2022

Devant un jury composé de

M. Emmanuel BROUILLET	Directeur de recherche	Président du jury
M. Eric BOUE-GRABOT	Directeur de recherche	Rapporteur
Mme Cécile DELARASSE	Directrice de recherche	Rapporteuse
Mme Yasmine CANTAUT-BELARIF	Chargée de recherche	Examinatrice

## RESUME

L'adénosine est une purine produite par les neurones et les cellules gliales dans le système nerveux central. Elle se fixe à des récepteurs spécifiques A1, A2A, A2B, A3. Les récepteurs A2A ( $A_{2A}R$ ) sont couplés à une protéine G activatrice de l'adénylate cyclase (AC), et leur activation favorise la production d'AMP cyclique (AMPc) et la neurotransmission glutamatergique. Les interactions du  $A_{2A}R$  avec des partenaires protéiques variés et au sein de multiples types cellulaires en fait un régulateur fin de la plasticité synaptique. Si le rôle de l'adénosine via les  $A_{2A}R$ s est bien documenté chez l'adulte, sa fonction au cours du développement cérébral reste peu explorée. Nous avons récemment montré qu'une augmentation transitoire de l'expression du  $A_{2A}R$  au cours de la synaptogenèse dans l'hippocampe coïncide avec son rôle dans la stabilisation des synapses GABAergiques inhibitrices naissantes (Gomez-Castro et al., Science 374, 2021). Nous nous sommes demandés si cette régulation s'étendait aussi aux synapses glutamatergiques.

Dans des cultures mixtes neurones-astrocytes-microglie, nous avons observé une augmentation transitoire de la densité d' $A_{2A}R$  près des synapses glutamatergiques entre le 7<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour *in vitro*, i.e. pendant le pic de formation des synapses glutamatergiques. Ces données sont confirmées *in vivo* en microscopie électronique. Dans ces cultures, la suppression du  $A_{2A}R$  neuronal par une approche de shARN induit la perte de ~30% de synapses glutamatergiques, identifiées avec les marqueurs pré- et postsynaptiques VGLUT1 et PSD-95. Cette délétion induit aussi une perte de synapses GABAergiques, suggérant que l'activation du  $A_{2A}R$  neuronal stabiliserait les synapses glutamatergiques et inhibitrices naissantes par un mécanisme commun. Bloquer le  $A_{2A}R$  avec l'antagoniste sélectif SCH-58261 ou en retirant l'adénosine ambiante a tendance à augmenter la densité des synapses excitatrices, et réduit significativement la mobilité des sous-unités GluA1 des récepteurs AMPA, confinées aux synapses. En accord avec ces modifications synaptiques, activer le  $A_{2A}R$  avec l'agoniste spécifique CGS-21680 uniquement en l'absence d'adénosine extracellulaire et au cours de la synaptogenèse, induit une perte de ~35% des synapses. La suppression des cellules gliales en présence d'ara-C, ou de la microglie spécifiquement avec du L-leucine méthylester ou du PLX5622 bloque ces effets. Ces résultats révèlent une régulation des synapses glutamatergiques dépendante des  $A_{2A}R$ s et impliquant des interactions neurogliales. Tandis que le  $A_{2A}R$  neuronal stabilise les synapses, les données suggèrent que l'activation du  $A_{2A}R$  microglial, ou d'un autre facteur microglial modulé par le  $A_{2A}R$  neuronal, induit plutôt une déstabilisation des synapses glutamatergiques. Appuyant cette hypothèse, lorsque les neurones sont transfectés avec le sh $A_{2A}R$  et traités avec du PLX5622, l'effet neuronal est confirmé et l'effet microglial est bloqué, ce qui indique que le  $A_{2A}R$  neuronal est au centre de la régulation, en contrôlant probablement l'activité des

microglies. De plus, la déstabilisation des synapses glutamatergiques par l'agoniste du  $A_{2A}R$  est empêchée en présence d'un anticorps bloquant la protéine du complément C1q. C1q contribuerait donc à un processus de stabilisation/déstabilisation des synapses glutamatergiques impliquant l'activation du  $A_{2A}R$  neuronal. Le mécanisme complément-dépendant reste à définir, ainsi que les voies de signalisation impliquées dans les effets des  $A_{2A}Rs$ , puisque la modulation des voies canoniques AMPc/AC ou MAPK (mitogen-activated protein kinases) n'a pas eu d'effets sur la régulation de la stabilisation des synapses glutamatergiques.

L'ensemble des résultats nous permet de proposer qu'au cours du développement, le récepteur  $A_{2A}$  neuronal est important dans la mise en place des réseaux glutamatergiques de l'hippocampe via une régulation neurogliale impliquant le système du complément.

## ABSTRACT

Adenosine is a purine produced by neurons and glial cells in the central nervous system. It binds to specific adenosine receptors A1, A2A, A2B and A3. A2A receptors ( $A_{2A}R$ ) are coupled to an adenylate cyclase (AC)-activating G protein and when activated, it favors cyclic AMP (cAMP) production and glutamatergic neurotransmission. The diversity of  $A_{2A}R$  interactions with various partners and within multiple cell types makes it a fine regulator of synaptic plasticity. If the role of adenosine via A2A receptors is relatively well documented in the adult, its function in the developing brain remains poorly explored. We recently showed that a transient increase of  $A_{2A}R$  expression during hippocampal synaptogenesis matched with a role in the stabilization of nascent inhibitory GABAergic synapses of the hippocampus (Gomez-Castro et al., Science 374, 2021). We asked here if this regulation extends to hippocampal glutamatergic excitatory synapses.

In mixed neuron-astrocyte-microglia cultures, we observed a transient increase in the density of  $A_{2A}R$  close to glutamatergic synapses between the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day *in vitro*, i.e. during the peak of glutamatergic synapse formation. This was confirmed *in vivo* using electronic microscopy. In mixed cultures, the suppression of neuronal  $A_{2A}R$  with a shRNA approach led to the loss of ~30% of glutamatergic synapses identified with the pre- and post- synaptic markers VGLUT1 and PSD-95. Suppressing the neuronal  $A_{2A}R$  also induced a loss of GABAergic synapses, which suggests that the activation of neuronal  $A_{2A}R$  would stabilize nascent glutamatergic and GABAergic synapses through a common mechanism. Globally blocking  $A_{2A}R$  in mixed cultures with the selective antagonist SCH-58261, or by removing ambient adenosine, tended to increase the density of VGLUT1/PSD-95 synapses, and significantly reduced the mobility of the AMPA receptor GluA1 subunits, which were trapped within synapses. In line, activating  $A_{2A}R$  with the selective agonist CGS-21680 in absence of extracellular adenosine and exclusively during synaptogenesis, led to a ~35% synapse loss. This effect was blocked upon depletion of glial cells with ara-C, or more specifically microglia with L-leucin methylester or PLX5622. Altogether, these data support an  $A_{2A}R$ -dependent regulation of glutamatergic synapses involving neuroglial interactions. While neuronal  $A_{2A}R$  stabilizes synapses, our data suggest that an activation of the microglial  $A_{2A}R$ , or another microglial factor modulated by neuronal  $A_{2A}R$ , rather promotes glutamatergic synaptic destabilization. In support of the latter possibility, when neurons were transfected with the sh $A_{2A}R$  and treated with PLX5622, the neuronal effect was confirmed and the microglial effect was blocked, indicating that the neuronal  $A_{2A}R$  is central in the regulation, probably controlling microglia activity. Further,  $A_{2A}R$  agonist-mediated glutamatergic synapse destabilization was blocked in presence of the complement protein C1q-neutralizing antibodies. C1q could

therefore contribute to a glutamatergic synapse stabilization/destabilization process involving neuronal  $A_{2A}R$  activation. The complement-based mechanism remains to be described as well as the signalling pathways involved in the regulatory effect of  $A_{2A}R$  as modulating canonical cAMP/AC or MAPK (mitogen-activated protein kinases) pathways remained inefficient to regulate glutamatergic synapse stabilization.

Overall, the present results allow to hypothesize that during development, the neuronal  $A_{2A}R$  is important in the establishment of hippocampal glutamatergic networks through a neuroglial regulation involving the complement system.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer les travaux réalisés au cours de ma thèse. Je remercie le D<sup>re</sup> Cécile Delarasse et D<sup>r</sup> Eric Boué-Grabot pour avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse ainsi que les D<sup>re</sup> Yasmine Cantaut-Belarif et D<sup>r</sup> Emmanuel Brouillet pour avoir accepté d'être examinateur.rice lors de la soutenance de ma thèse.

Je souhaite remercier Sabine et David pour leur disponibilité et leur écoute en tant que directrice et directeur de thèse. Je vous remercie pour le partage de votre passion pour les neurosciences, et vos visions complémentaires sur les synapses et le récepteur A2A pour penser ce projet de thèse. Sabine, je te remercie pour ton investissement et l'aide que tu m'as apportée tout au long de cette thèse. David, je te remercie aussi pour ton soutien et le recul scientifique que tu m'as apporté sur le projet. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée. Je suis convaincue que la suite du projet permettra d'écrire une superbe histoire sur le A<sub>2A</sub>R et les synapses glutamatergiques !

Je remercie également Emilie pour ton aide, ta disponibilité et tes conseils qui ont été précieux au cours du projet. Merci !

A l'institut Neuroscience & Cognition, je remercie aussi Kévin et Bryan pour leur aide sur les récepteurs A2A, et Luc pour m'avoir accueillie dans l'équipe. Je tiens à remercier tout particulièrement Agathe pour ton aide et ta gentillesse lors de mes venues à Lille. Merci beaucoup !

Au sein de l'institut du Fer à Moulin, je remercie toute l'équipe pour votre soutien et l'entraide qui nous ont permis d'avancer dans nos projets respectifs. Merci Florian pour ton aide précieuse lors de notre cohabitation dans le bureau sud, et tes conseils musicaux à souhait ! Merci à Zaha, Anne-Lise, Marion et Erwan pour votre soutien lors de notre cohabitation dans le bureau nord, et merci Jérémy d'avoir piqué tous nos snacks ! Je suis vraiment reconnaissante d'avoir poursuivi ma thèse avec de si bon.ne.s collègues, et sans vous et votre motivation, je n'aurais certainement pas autant apprécié de travailler au laboratoire. Je souhaite remercier Chloé et Solen qui ont travaillé avec moi lors du projet. Vous avez vraiment été de super stagiaires et je suis contente de vous avoir eu à mes côtés au cours de la thèse. Je souhaite aussi remercier Marianne et Jean-Christophe pour votre disponibilité, vos conseils et vos questions lors des réunions d'équipe.

Je tiens à remercier Catherine pour ta disponibilité, ta bonne humeur, et le partage de ta passion pour la purification de microglies ! Je remercie également Anne pour ton aide au cours du projet, dans mon comité de thèse ou pour les manips. Merci Sophie et Aude pour votre aide

précieuse et votre pédagogie. Je remercie aussi Mythili pour ta gentillesse lorsque l'on se croisait (souvent !) au DM6000-2. Merci aussi à Baptiste et Alix pour leur accueil dès mes premiers jours à l'institut. Merci à Imane et Mathieu pour leur soutien. Je souhaite remercier Xavier Nicol et Fiona pour leur collaboration sur les expériences AC/AMPc.

A l'institut, j'ai aussi eu la chance de passer cette thèse en compagnie de deux amis (bretons) incroyables. Célia, je ne peux pas t'exprimer ici tout ma gratitude mais tu sais combien ta présence a compté pour moi, et je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté en conseils, câlins et petits trucs à grignoter... Merci pour tout mon bib. Rémi, (ou RR, ou RDF) tu es tout simplement mon rayon de soleil. Je te remercie pour ta présence qui a toujours été si juste, nos discussions toujours plus inventives, et nos fous rires beaucoup trop fréquents ! Tu as un cœur grand comme ça.

Je tiens à remercier Naya pour ta bienveillance (spéciale mention à notre colocation en juin !), et je suis heureuse partager avec toi une passion pour les mêmes groupes de musique. Merci à Maëliiss pour ta gentillesse, et ton aide dans la pièce BET. Merci à Billel, Facundo et Eléonore pour votre bonne humeur au 1<sup>er</sup> !

Pour les anciens... Merci Xavier pour toute l'aide que tu m'as apportée, et tes bons conseils. Tu es la première personne que j'ai rencontrée en arrivant dans l'équipe, et je ne pensais pas que les sessions PALM/STORM mèneraient à une amitié hors des murs du labo, et devant des murs de son ! Merci pour ton soutien. Je tiens à remercier Amina pour ta présence tout au long de ma thèse, tes conseils toujours avisés, ta confiance et ta bonne humeur. Après le manuscrit, promis on retente les Mardi nouilles !

Je souhaite remercier Anass pour toutes les discussions passionnantes qui sont nées à l'IFM et qui se sont échappées en dehors, quelle joie de t'avoir toi et Laetitia dans ma vie ! Merci à tous les deux pour votre bienveillance et votre énergie.

Un merci tout particulier à Johann, et à notre collaboration à l'IDV qui a fait naître une amitié précieuse (et hilarante). Tu fais toi aussi partie de mes trentenaires préférés !

Je tiens à remercier Hélène pour ta disponibilité et ta bienveillance. Par tes mots, on se sent poussée vers le haut et comprise. Une mention spéciale à ton soutien pendant la période du manuscrit. Un merci tout salé à Lisa pour ton amitié et ta gentillesse.

Alexia, je t'exprime toute ma reconnaissance pour ce que tu m'as apporté. Tu es si importante pour moi. Ton écoute et ton soutien depuis le début de notre amitié en Master ont été des piliers pour grandir, et traverser les événements que nous n'avions pas vu venir en 2021. Merci pour tout, et vivement nos retrouvailles de bib.



Je voudrais te remercier Maé, de toujours avoir été là, depuis bientôt 10 ans. Tu es la plus belle rencontre de ma vie, et notre amitié est inestimable. J'ai tenté de comprendre pendant ma thèse en neurosciences comment nos cerveaux pouvaient être si connectés, mais je n'ai toujours pas d'explications... En tout cas, ta présence a suffi à rendre mes jours meilleurs.

Je tiens à remercier les zouzs de Saint-Etienne, Louise, Charlotte, Isaure, Gaby et Laura, pour votre bienveillance et vos lumières sur la vie. Vous êtes géniales. Louise, Charlotte, Isaure, merci d'être toujours là pour m'aider à relativiser, et rire. Merci Etienne pour ton soutien et ta gentillesse. T'avoir comme ami (et voisin) est précieux. Un merci à Garance et Oscar, parce que Sainté fait naître les meilleurs crus, et ils se boivent à Paris.

Merci aux kavs de Rennes, vous rencontrer a marqué un tournant dans ma vie et je vous en serai toujours reconnaissante. Mercis tout particuliers à Vincent, Nanar, JM, Florian, BLP, Claire et Hélo.

Je remercie aussi mes copains de Nantes, Nathan, Maurice, Charly, Sarah, Anne-Laure, Charlotte, Lisou, Alex, Hugo. Merci Mathilde pour ton soutien et ton sourire, et vivement notre prochaine colocation.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille pour son immense soutien et amour. Merci à mes parents qui m'inspirent et me poussent à faire de mon mieux. Votre écoute et vos conseils me sont d'une grande aide dans la vie, et l'ont été pour cette thèse. Merci à ma sœur Elsa et mon frère Hugo pour votre gentillesse et votre présence bienveillante depuis toujours. Merci Chloé pour ton soutien et ton attention, et merci Alix d'agrandir cette famille pleine d'amour.

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	1
ABSTRACT .....	3
REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	8
ABREVIATIONS .....	12
INTRODUCTION .....	14
1. Synaptogenèse et réseaux glutamatergiques .....	14
1.1. Organisation de la synapse glutamatergique : la synapse est une structure dynamique.....	15
1.1.1. Compartiment présynaptique glutamatergique .....	16
1.1.2. Compartiment postsynaptique glutamatergique.....	17
1.1.3. Régulations de l'organisation de la synapse excitatrice et de la fente synaptique.....	20
1.1.4. La synapse est une structure dynamique .....	22
1.2. Synaptogenèse et stabilisation des synapses glutamatergiques .....	25
1.2.1. Différents timings de formation des synapses GABA- ou glutamatergiques .....	25
1.2.2. La formation des synapses excitatrices suit un processus précis : pistes des mécanismes de synaptogenèse .....	26
1.2.2.1 Rapprochement et reconnaissance progressive entre l'axone et le neurone cible.....	27
1.2.2.2. Transports de composés pré- et postsynaptiques le long de l'axone et de la dendrite .....	29
1.2.2.3. Rôle des CAMs dans les interactions bidirectionnelles à la synapse en développement.....	31
1.2.2.3.1. La signalisation neurexine-neurologine .....	32
1.2.2.3.2. Le rôle des cadhérines .....	33
1.2.2.3.3. Les latrophilines .....	34
1.2.2.3.4. Autres molécules impliquées dans l'adhésion au niveau des synapses .....	34

1.2.2.4. Rôle du BDNF à la synapse .....	35
1.2.3. La synaptogenèse est un mécanisme activité-dépendant .....	36
1.3. Rôle des cellules microgliales et astrocytaires dans la régulation des synapses au cours du développement .....	38
1.3.1. L'élagage des synapses est essentiel pour le développement normal du cerveau : territoires microgliaux et astrocytaires .....	39
1.3.1.1. Les microglies modifient la plasticité des synapses par leur motilité et la libération de molécules trophiques .....	39
1.3.1.2. Les microglies sculptent les circuits neuronaux.....	40
1.3.1.2.1. Formation des synapses médiée par les microglies.....	40
1.3.1.2.2. Modulation de l'activité des synapses par les microglies .....	41
1.3.1.2.3. Elimination des synapses par les microglies au cours du développement du SNC .....	42
1.3.1.3. Le système du complément régule les circuits neuronaux .....	46
1.3.1.4. Rôle de l'activité neuronale dans l'élimination des synapses .....	48
1.3.1.5. Les astrocytes maintiennent l'homéostasie des réseaux neuronaux dans le SNC .....	51
1.3.1.5.1. Les astrocytes modulent l'activité des synapses et leur formation	51
1.3.1.5.2. Les astrocytes participent à l'élimination des synapses .....	52
1.3.2. Des altérations dans l'élimination des synapses à l'origine de nombreuses pathologies .....	54
2. Signalisations purinergique et adénosinergique dans la communication intercellulaire, le développement des circuits neuronaux et la maturation des synapses .....	56
2.1. Signalisation purinergique au niveau cellulaire et moléculaire .....	57
2.1.1. Sources d'ATP et d'adénosine : métabolisme et transport des purines .	57
2.1.2. Récepteurs à l'ATP et à l'adénosine .....	61
2.1.3. Les voies de signalisation associées aux A <sub>2A</sub> R .....	69
2.2. La signalisation adénosinergique dans différents types cellulaires a des rôles variés dans la physiologie du SNC .....	70
2.2.1. Rôle des A <sub>2A</sub> R dans les neurones .....	71
2.2.1.1. Modulation de l'excitabilité neuronale : rôle de neuromodulateur du A <sub>2A</sub> R en présynaptique.....	71

2.2.1.2. Modulation de l'excitabilité neuronale : rôle de neuromodulateur du A <sub>2A</sub> R en postsynaptique .....	72
2.2.1.3. A <sub>2A</sub> R et BDNF .....	72
2.2.2. Rôle des astrocytes dans la signalisation adénosinergique.....	74
2.2.2.1. Rôle indirect des astrocytes sur les A <sub>2A</sub> Rs synaptiques .....	74
2.2.2.2. Rôle des A <sub>2A</sub> Rs astrocytaires dans les mécanismes de recapture de neurotransmetteurs .....	75
2.2.3. Rôle du A <sub>2A</sub> R dans les microglies .....	76
2.2.3.1. Les récepteurs A <sub>2A</sub> modulent l'activation et la prolifération des microglies .....	76
2.2.3.2. Les A <sub>2A</sub> Rs régulent la libération de signaux inflammatoires par les microglies .....	77
2.2.4. Signalisation A <sub>2A</sub> R dans les oligodendrocytes et au niveau des cellules épithéliales .....	78
2.2.4.1. Les A <sub>2A</sub> Rs régulent la maturation des oligodendrocytes.....	78
2.2.4.2. Les A <sub>2A</sub> Rs modulent la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique .....	78
2.2.5. L'adénosine régule de multiples comportements dans l'organisme adulte	79
2.2.5.1. Rôle du A <sub>2A</sub> R dans l'apprentissage et la mémoire .....	79
2.2.5.2. Rôle du A <sub>2A</sub> R dans les ganglions de la base .....	79
2.2.5.3. Rôle de l'adénosine dans la régulation du sommeil et des cycles éveil/sommeil .....	79
2.2.5.4. Neuroinflammation et neuroprotection.....	80
2.2.6. L'adénosine est impliquée dans de nombreuses pathologies.....	80
2.2.6.1. A <sub>2A</sub> R et déficits mnésiques .....	81
2.2.6.2. Maladie de Parkinson et tonus adénosinergique dans le striatum.....	81
2.3. La signalisation adénosinergique au cours du développement dans l'hippocampe .....	82
2.3.1. Expression et localisation de protéines de la signalisation adénosinergique au cours de la synaptogenèse dans l'hippocampe.....	82
2.3.2. La modulation de la signalisation adénosinergique au cours du développement précoce module les circuits neuronaux.....	84
2.3.2.1. Les A <sub>2A</sub> Rs : à l'origine d'un mécanisme de stabilisation des synapses GABAergiques naissantes .....	84

2.3.2.2. Les A <sub>2A</sub> Rs sont impliqués dans la croissance des axones et dendrites	85
2.3.2.3. L'adénosine est impliquée dans la migration des neurones inhibiteurs .....	86
2.3.2.4. Bloquer les A <sub>2A</sub> Rs au cours du développement altère la formation des circuits neuronaux hippocampiques .....	86
2.3.2.5. Le A <sub>2A</sub> R régule-t-il l'élagage de synapses médié par les microglies ?	87
OBJECTIFS DE LA THESE.....	89
MATERIEL ET METHODES.....	91
RESULTATS .....	108
DISCUSSION .....	145
BIBLIOGRAPHIE.....	169

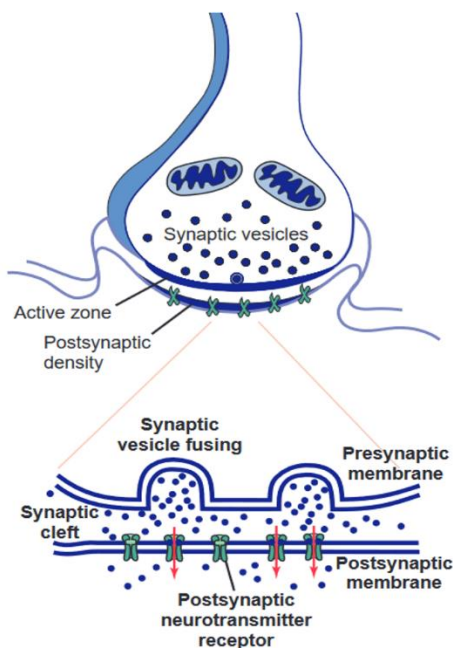
## ABREVIATIONS

A1R	Récepteur à l'adénosine A1
A2AR	Récepteur à l'adénosine A2A
A2BR	Récepteur à l'adénosine A2B
A3R	Récepteur à l'adénosine A3
AC	Adénylate cyclase
ADA	Adénosine déaminase
ADK	Adénosine kinase
AMPA	Acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPCP	5'-[ $\alpha,\beta$ -méthylène]diphosphate
ara-C	Cytosine arabinoside
ATP	Adénosine triphosphate
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (Facteur neurotrophique dérivé du cerveau)
CA1/3	Cornu Ammonis
CaM	Calmoduline
CaMKII	Protéine kinase dépendante du calcium/CaM
CAMs	Molécules d'adhésion cellulaire
CAZ	Cytosquelette associé à la zone active
CB1R	Récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CREB	cAMP-responsive element-binding protein
CX3CR1	Récepteur à la fractalkine (CX3CL1)
Cx43	Connexine 43
D2R	Récepteur à la dopamine D2
DG	Gyrus denté
DIV	Jour in vitro
ENT1/2	Transporteurs équilibratifs aux nucléosides
EphR	Récepteur à l'éphrine
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GAD	Décarboxylase des acides glutamiques
GFP	Green fluorescent protein (protéine fluorescente verte)
GPC4/6	Glypican 4/6
LPS	Liposaccharides
LTP	Potentiation à long terme
MA	Maladie d'Alzheimer
MAGUK	Membrane-Associated Guanylate Kinases
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Kinase MAPK/ERK
mEPSCs	Courants miniatures postsynaptiques excitateurs
mGluR	Récepteur métabotrope au glutamate
MHC1	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1
MP	Maladie de Parkinson
NL	Neurologine
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Monoxyde d'azote

NP1	Pentraxine neuronale 1
P2X/Y	Récepteur purinergique à l'ATP
PALM	Microscopie par localisation photoactivée
PI3K	Phosphoinositide-3-kinases
PKA	Protéine kinase A
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylsérine
PSD	Postsynaptic density (densité postsynaptique)
Px	Jour postnatal x
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SAH	S-adénosyl-homocystéine
SNC	Système nerveux central
STORM	Microscopie de reconstruction optique stochastique
SV	Vésicules synaptiques
TARPs	Protéines transmembranaires régulatrices du récepteur AMPA
TNF- $\alpha$	Facteur de Nécrose Tumorale $\alpha$
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TrkB	Récepteur à tyrosine kinase B
TSA	Troubles du spectre autistique
TTX	Tétradotoxine
VGLUT	Transporteur vésiculaire au glutamate
VNUT	Transporteur vésiculaire aux nucléotides

# INTRODUCTION

## 1. Synaptogenèse et réseaux glutamatergiques



Organisation générale d'une synapse glutamatergique (Cohen-Cory, 2002)

Les synapses neuronales sont des zones de communication intercellulaires asymétriques, formés par deux neurones. Il existe des synapses chimiques qui fonctionnent par la sécrétion de neurotransmetteurs, neuropeptides, endocannabinoïdes ou monoamines, et des synapses électriques, plus rares, communiquant par des jonctions GAP qui permettent des flux ioniques.

Des milliards de synapses constituent l'unique connectivité du cerveau. La formation des synapses, ou **synaptogenèse**, se produit tout au long de la vie mais est un processus crucial au cours de la période de développement du système nerveux central (SNC). Les synapses sont produites en grande quantité puis elles sont sélectivement stabilisées ou éliminées au cours de la période postnatale, ce qui participe à l'établissement de la connectivité neuronale. **De nombreux mécanismes de formation et de maintenance des**

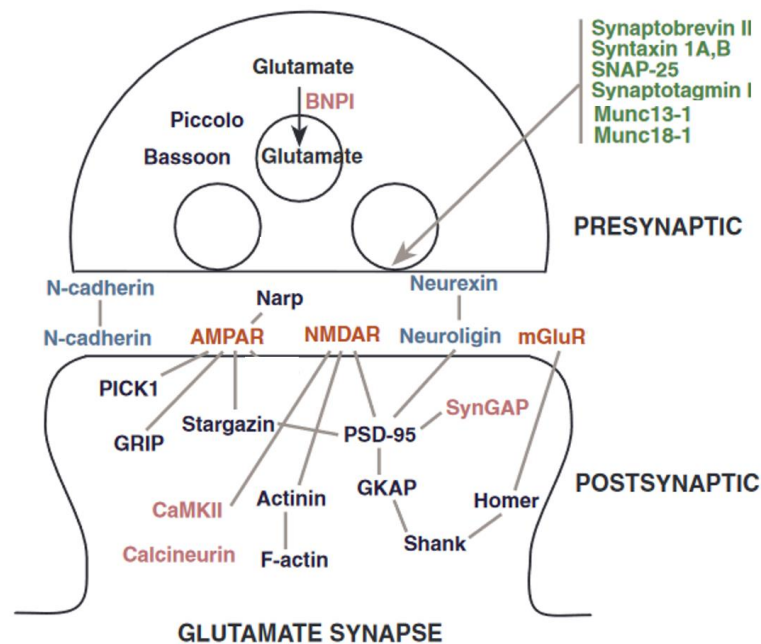
**synapses restent cependant inconnus.** L'activité principale au niveau de la synapse est de transférer les signaux médiés par un ou des neurotransmetteur(s) de manière unidirectionnelle de la zone présynaptique à postsynaptique, et de traiter les informations encodées par ces signaux. La transmission synaptique passe par l'exocytose, contrôlée temporellement et spatialement, de neurotransmetteurs contenus dans des vésicules présynaptiques, et la détection de ces molécules par des récepteurs postsynaptiques précisément situés à la synapse. Les synapses sont des structures très diverses qui se différencient par les types de neurotransmetteurs produits, leur probabilité de libération, la composition en récepteurs postsynaptiques, et leur plasticité sur le court ou long terme.

Je décrirai dans un premier temps l'organisation moléculaire de la synapse glutamatergique et ses dynamiques, puis je présenterai les processus contrôlant la formation et stabilisation des synapses. Enfin, je décrirai les rôles des cellules gliales dans ces processus ainsi que dans l'élimination des synapses au cours du développement et de la maturation du SNC des Vertébrés.



## 1.1. Organisation de la synapse glutamatergique : la synapse est une structure dynamique

Dans cette partie, je décrirai la composition et la dynamique des synapses excitatrices. La majorité des synapses glutamatergiques est localisée au niveau de protrusions de dendrites appelées **épinés dendritiques** (Fiala et al., 1998). Les synapses neuronales sont des **structures asymétriques**, composées de zones actives pré- et postsynaptiques séparées par une fente synaptique de 20nm. La zone présynaptique contient un nombre précis de vésicules synaptiques apposées à la membrane, ainsi qu'un large pool de vésicules ancré à proximité. La zone postsynaptique contient une région membranaire spécialisée caractéristique, la **densité postsynaptique (PSD)** constituée de récepteurs aux neurotransmetteurs, des canaux ioniques et des protéines associées (Ahmari and Smith, 2002). Une communication bidirectionnelle continue entre ces zones pré- et postsynaptiques modifie leur composition, qui est très hétérogène. Même si certaines protéines synaptiques sont exprimées et distribuées au niveau de tous les neurones et toutes les synapses, d'autres sont exprimées spécifiquement dans des sous-types neuronaux. De plus, la composition de ces compartiments est influencée par des signaux antérogrades issus de la partie présynaptique, notamment l'activité et la nature des neurotransmetteurs libérés à la synapse, et je présenterai ici la **synapse glutamatergique** en particulier. Des événements postsynaptiques peuvent aussi influencer la composition présynaptique, et l'ensemble de ces régulations sont à l'origine d'une diversité synaptique considérable (Craig and Boudin, 2001).

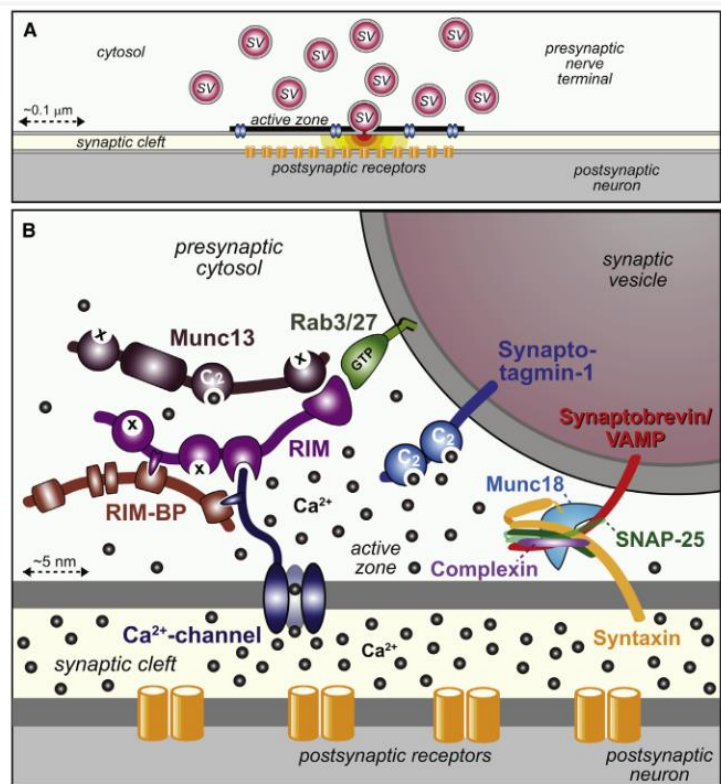


Protéines principales des compartiments pré- et postsynaptiques de la synapse excitatrice (Craig and Boudin, 2001)

### 1.1.1. Compartiment présynaptique glutamatergique

Dans la zone présynaptique, des enzymes de synthèse et des transporteurs vésiculaires ou membranaires de neurotransmetteur déterminent la **nature chimique des synapses**. Au niveau des synapses excitatrices, il s'agit du **glutamate**, qui est le **neurotransmetteur excitateur principal** dans les SNC des Vertébrés. Il a un rôle trophique et régule la formation, la maturation et la plasticité des synapses. Avant d'être sécrété, le glutamate est stocké dans des vésicules synaptiques à une concentration proche de 60mM, et son transporteur principal est **VGLUT1 (Vesicular glutamate transporter 1)** dans les neurones hippocampiques, aussi appelé BNPI (Brain-specific neuronal phosphate transporter) (Varoqui et al., 2002). L'expression de VGLUT1 permet d'augmenter l'entrée de glutamate dans des vésicules présynaptiques et sa libération dans la fente synaptique (Takamori et al., 2000). VGLUT2 est exprimé dans le thalamus et la moelle épinière, mais ces deux transporteurs sont colocalisés dans l'hippocampe au cours du développement, exprimés à la membrane des mêmes vésicules synaptiques (Herzog et al., 2006).

Un ensemble de protéines présynaptiques régulent les processus de libération du glutamate dans la fente synaptique. Dans le compartiment présynaptique, un pool de vésicules synaptiques (VS) sphériques (de 35-45nm de diamètre), contenant du glutamate et de l'ATP, est présent à la membrane (Ahmari and Smith, 2002). Les VS, qui expriment la **synaptotagmine capable de détecter les niveaux de calcium**, sont situées au niveau de la zone active et associées à un complexe protéique composé de RIM et Munc13, essentiel pour recruter et ancrer les VS ainsi que des canaux calciques au niveau de la zone active. Un complexe unique composé des VS et des canaux calciques est ainsi formé. La synaptotagmine induit l'exocytose des VS, qui est médiée par l'activité d'un complexe protéique composé de **protéines SNARE (soluble NSF attachment receptor)** et **SM ('Sec1/Munc18-like)**. La structure de la zone active permet donc la fixation rapide de  $Ca^{2+}$  sur la synaptotagmine et déclenche la **fusion des VS**, associées à des complexines. L'assemblage des complexes protéiques SNARE, composés de **SNAP-25 et syntaxine-1**, nécessite l'activation cette dernière, qui induit la fusion des VS à la membrane. La synaptobrevine (VAMP) forme des complexes stables avec ces protéines présynaptiques et permet de coordonner l'amarrage et l'exocytose des VS. L'efficacité de la zone active permet de coupler l'arrivée de potentiels d'action à la libération de neurotransmetteur en quelques millisecondes (Südhof, 2012, 2013). La zone active de la synapse glutamatergique est aussi composée d'un réseau de filaments du cytosquelette associés à la zone active (CAZ) composée des protéines Piccolo et Bassoon (Zhai et al., 2001). Piccolo serait un marqueur de l'assemblée d'une zone active naissante.



L'organisation de la zone présynaptique est définie par de nombreuses protéines du complexe SNARE au cœur des processus d'exocytose de vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteur, et des protéines régulatrices comme Munc13-1 et Munc18-1 (Südhof, 2013)

Le compartiment présynaptique présente une **forte diversité** en fonction de la probabilité de libération de neurotransmetteurs, qui dépend de la taille du site de libération, la quantité de vésicules synaptiques disponibles, et des différences de densité de canaux calciques. Cette diversité est à l'origine d'efficacités synaptiques et de sensibilité à des modulateurs pharmacologiques variables. Les neurones peuvent aussi former des synapses sur leurs propres dendrites, appelées **autapses**, et là aussi des différences d'expression de protéines associées aux vésicules présynaptiques sont observées, au sein d'une même cellule (Craig and Boudin, 2001).

### 1.1.2. Compartiment postsynaptique glutamatergique

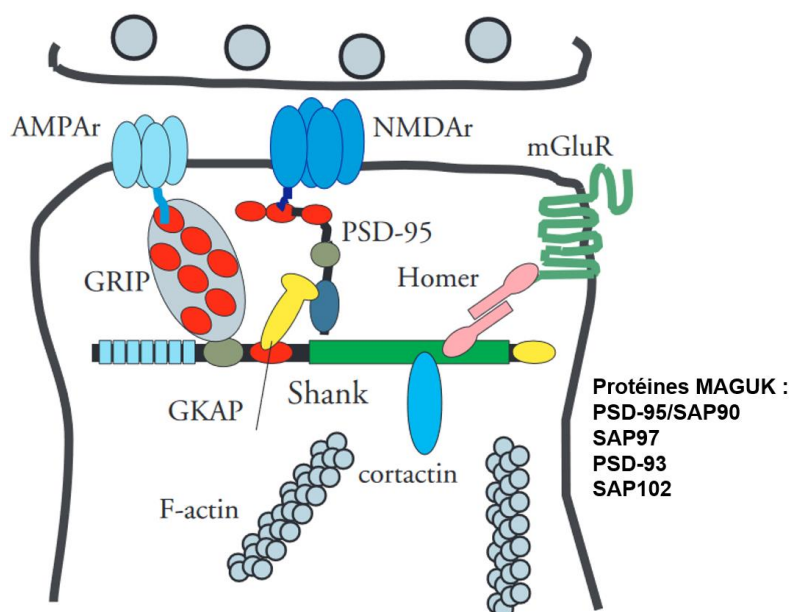
La zone postsynaptique s'apparie avec la zone présynaptique en fonction de la nature du neurotransmetteur libéré au niveau de cette dernière. Les synapses glutamatergiques sont caractérisées par une spécialisation de la membrane postsynaptique appelée **densité postsynaptique (PSD)**. En face de la zone active de la synapse glutamatergique, des **récepteurs spécifiques** fixent le glutamate libéré dans la fente synaptique et se trouvent au

niveau de la PSD (Scheefhals and MacGillavry, 2018). Le glutamate peut se fixer sur des récepteurs postsynaptiques **ionotropiques** e.g. **NMDA (N-methyl-D-aspartate)**, **kainate** et **AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)**. Ces récepteurs ionotropiques sont activés par la liaison du glutamate et sont des canaux cationiques non sélectifs. Ils modulent le flux des ions  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ . Les récepteurs NMDA (NMDARs) sont activés par la fixation du glutamate et de la glycine, mais ils contiennent un site interne de fixation pour le  $Mg^{+}$  qui bloque l'activité du canal. Le canal peut s'ouvrir lorsque la membrane est suffisamment dépolarisée, cette dépolarisation peut faire suite à l'activation des récepteurs AMPA (AMPARs) (Zhu et al., 2000; Washbourne et al., 2002). Les NMDARs sont composés des sous-unités NR1, NR2 et NR3 ont une affinité près de 500 fois plus forte pour le glutamate que les récepteurs AMPA (Patneau and Mayer, 1990; Paoletti and Neyton, 2007), qui sont composés des sous-unités GluA1 à GluA4 (Esteban et al., 2003). Les AMPARs et NMDARs médient la majorité de la transmission synaptique excitatrice. Les récepteurs au kainate, malgré leur homologie structurelle avec ces derniers, ont des fonctions plus diverses dans la régulation des circuits neuronaux (Carta et al., 2014). Le glutamate peut aussi se fixer sur des récepteurs **postsynaptiques métabotropiques (mGluRs)**. Les mGluRs sont des récepteurs couplés aux protéines G, ils sont divisés en 3 groupes et 8 sous-types et leur activation aux synapses dans l'hippocampe médie des réponses postsynaptiques (Luján et al., 1996). **La fixation du glutamate sur ses récepteurs permet la transduction de l'information entre les neurones** (Frank and Grant, 2017). **L'efficacité de la neurotransmission dépend du nombre de récepteurs accumulés au niveau de la PSD** (Choquet and Triller, 2013). Le glutamate libéré peut aussi être recapturé rapidement par les astrocytes, où il est converti en glutamine. La glutamine est libérée et transformée en glutamate au sein des neurones via l'action de la glutaminase mitochondriale. Cette compartimentation métabolique consiste en un cycle « glutamate-glutamine » (Daikhin and Yudkoff, 2000).

Une des protéines les plus abondantes de la PSD est la kinase **CaMKII $\alpha$  ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase  $\alpha$ )** qui est liée aux NMDARs et activée par les flux de calcium médiés par les NMDARs. Elle permet aussi le recrutement de protéasomes aux synapses actives, ce qui induit la dégradation locale de protéines et leur turnover (Bingol et al., 2010). L'isoforme **CamKII $\beta$**  se lie à la F-actine et a un rôle de stabilisation de la structure et morphologie des épines dendritiques. Les PSDs sont aussi enrichies en **protéines d'échafaudage** qui permettent la structure et la plasticité de la synapse glutamatergique (Sheng and Kim, 2011). La principale protéine d'échafaudage de la synapse excitatrice est la **PSD-95 (Postsynaptic density protein 95)** ou SAP90 (Curran et al., 2021; Kedia et al., 2021). PSD-95 interagit avec de nombreuses autres protéines de la PSD, comme **SynGAP**, une protéine activatrice des GTPase Ras, fortement exprimée dans les neurones pyramidaux, où elle est requise pour les phénomènes de LTP, plus particulièrement au niveau des épines

dendritiques (Kim et al., 1998). La famille de protéines d'échafaudage **GKAP** interagit avec le domaine C-terminal des PSD-95, et se lie aux protéines **Shank** (Sheng and Kim, 2000), qui ont un rôle dans le développement des synapses glutamatergiques, la croissance des épines dendritiques et la transmission synaptique en interagissant avec **Homer**. La famille de protéines Homer sont aussi associées aux récepteurs métabotropiques mGlu1/5 (Brakeman et al., 1997). Ces interactions entre les protéines d'échafaudage de la PSD permettent un ancrage profond des protéines dans l'épine dendritique et leur interaction avec le cytosquelette. En effet, en plus de PSD-95, il existe aussi **PSD-93, SAP97 ou SAP102** qui participent à l'ancrage des récepteurs glutamatergiques à la PSD. Ces protéines appartiennent à la famille des **MAGUK (membrane associated guanylate kinase)**, qui jouent un rôle majeur dans l'organisation des synapses neuronales en se liant au **cytosquelette d'actine**. Par exemple, SAP97 est liée à la myosine VI et l'actine, et PSD-95 à la SPARactine. Le complexe **PSD-95–GKAP–Shank** est maintenu par la **cortactine et l'actine**. Les PSD-95 sont connectés aux NMDARs via les cytosquelettes d'actinine et d'actine (Zheng et al., 2010).

Les MAGUKs se lient directement aux récepteurs NMDA (Kim and Sheng, 2004), et indirectement aux récepteurs AMPA, via des **TARPs (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins)**, comme la **stargazine**. Associée aux AMPARs, elle régule leur expression membranaire ainsi que leur localisation à la synapse, en interagissant avec PSD-95 (Choi et al., 2002). PSD-95 interagit aussi avec la protéine **TANC1**, fortement exprimée dans l'hippocampe, qui régule les épines dendritiques (Han et al., 2010).



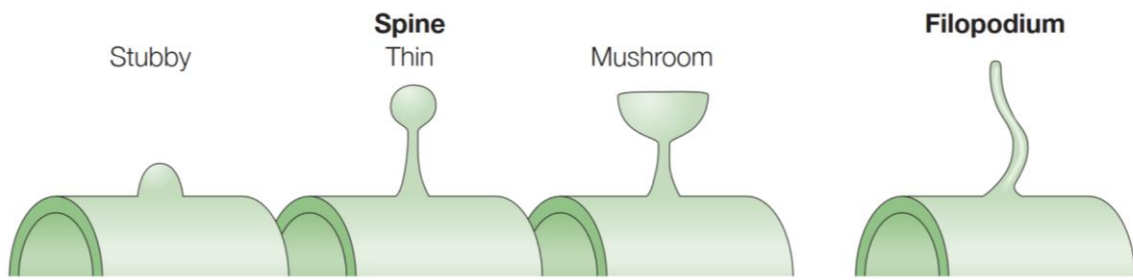
Le compartiment postsynaptique est composé de récepteurs au glutamate ancrés à des protéines d'échafaudage qui interagissent avec le cytosquelette d'actine (Sheng and Kim, 2000)

Les protéines d'échafaudage et le cytosquelette d'actine soutiennent l'architecture de la synapse et régulent la répartition des récepteurs glutamatergiques à la membrane. En fait, les synapses peuvent présenter plusieurs PSDs, constitués de AMPARs et NMDARs sous forme de **nanodomains** au sein de la synapse excitatrice. Les synapses dans l'hippocampe contiennent en moyenne 1 à 3 nanodomains de 80-100nm de diamètre, composés d'une vingtaine de récepteurs. Les récepteurs NMDA sont souvent groupés au centre de la PSD (Nair et al., 2013).

Cette organisation précise des synapses, qui portent une identité glutamatergique, permet une neurotransmission efficace et est régulée par plusieurs processus.

### 1.1.3. Régulations de l'organisation de la synapse excitatrice et de la fente synaptique

Le rôle des PSDs est de maintenir l'apposition entre les membranes pré- et postsynaptiques, de regrouper les récepteurs postsynaptiques, et de coupler ces récepteurs aux signalisations dans le neurone postsynaptique. Les protéines de la synapse glutamatergiques peuvent être régulées à différents niveaux. La **modification de la composition moléculaire des synapses** peut médier des modifications de la fonction et de la plasticité des synapses. Par exemple, la localisation des PSDs à la synapse augmente au cours du développement postnatal. Dans l'hippocampe, SAP-102 est exprimée tôt dans le développement, est associée préférentiellement aux NMDARs contenant à la sous-unité NR2B, et participerait à l'organisation des récepteurs NMDARs à cette période précoce du développement postnatal. Ensuite, de plus en plus de synapses expriment PSD-95 au cours du développement et au stade adulte, ce qui est corrélé à l'augmentation de l'expression des sous-unités NR2A des NMDARs ainsi que la présence de AMPARs à la synapse (Sans et al., 2000; Al-Hallaq et al., 2007). Ces changements de composition peuvent modifier le cytosquelette d'actine associé et s'accompagner de variations de la **morphologie des épines dendritiques**, et leur efficacité. Par exemple, la surexpression de protéines postsynaptiques comme PSD-95 ou Shank augmente la transmission synaptique ainsi que la taille et la densité des épines dendritiques (Chen et al., 2014). Les **épines dendritiques**, identifiées comme telles par Ramón y Cajal en 1888 (« espinas »), sont des structures très dynamiques grâce au **cytosquelette d'actine** qui les compose, et la présence de la **famille des GTPases Rho RhoA, Rac1, et Cdc42** qui participent à la structuration des voies de signalisation et aux changements de morphologie dans de nombreux types cellulaires. Ces protéines jouent un rôle primordial dans la réorganisation du **cytosquelette d'actine**. Par exemple, activer RhoA perturbe le développement de l'arbre dendritique en favorisant la rétractation des neurites *in vitro* (Li et al., 2000).



Différentes morphologie des épines dendritiques (Yuste and Bonhoeffer, 2004)

En fait, la **fente synaptique** est composée de multiples protéines qui définissent des sous-compartiments que l'on peut caractériser de nanodomains. Il s'agit d'une structure dynamique qui définit les interactions entre les compartiments pré- et post-synaptiques (Perez de Arce et al., 2015). Les **molécules d'adhésion cellulaire (CAMs)** sont multifonctionnelles au sein de l'organisme car elles régulent de nombreuses fonctions non-neuronales. Les synapses sont des structures **asymétriques** et les **CAMs médient des interactions hétérophiliques aux synapses**, alors qu'elles agissent en tant qu'homophiliques au niveau de jonctions d'adhérence ou serrées. Il existe une grande diversité de CAMs dans la fente synaptique (Südhof, 2017; Honig and Shapiro, 2020). Ces **protéines trans-synaptiques** peuvent aussi moduler l'organisation des synapses excitatrices et nous décrirons plus loin leur rôle dans la formation des synapses glutamatergiques. Comme mentionné précédemment, les synapses sont composées de **nanodomains moléculaires** et ceux-ci sont précisément alignés pour optimiser la transmission des signaux entre les compartiments pré- et post-synaptiques (Mariotti and Tripodi, 2019; Heine and Holcman, 2020). Par exemple, des nanoclusters de la protéine RIM présynaptique sont alignés avec des nanoclusters de la PSD-95 et des AMPARs et les patterns de distributions de PSD-95 déterminent la localisation des AMPARs (Nair et al., 2013; Biederer et al., 2017). PSD-95 ancre les AMPARs à la membrane via les TARPs, en particulier la stargazine. L'interaction de la stargazine avec PSD-95 permet de cibler les AMPARs à la synapse, tandis que son interaction avec les sous-unités des AMPARs permet leur fonction (Chen et al., 2000; Schnell et al., 2002).

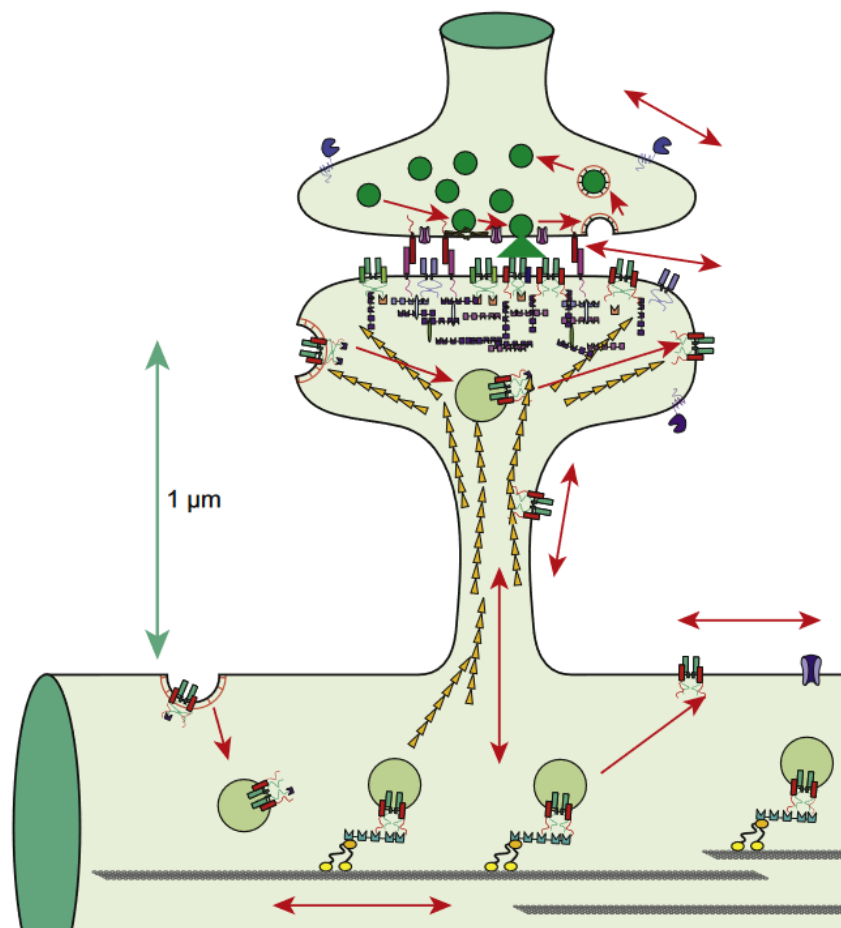
La protéine LGI1 et son récepteur ADAM22 forment un complexe et sont essentiels à la transmission synaptique des AMPARs et NMDARs. Sans cette association, PSD-95 ne peut pas potentialiser la fonction des AMPARs (Fukata et al., 2021).

L'organisation des synapses glutamatergiques est aussi modifiée par l'action de **kinases et phosphatases**. La phosphorylation des sous-unités GluA1 et GluA4 par la PKA (protéine kinase A) modifie le ciblage du AMPARs à la synapse (Esteban et al., 2003; Dias et al., 2012). L'action de la PKA est suffisante pour affecter la neurotransmission excitatrice en modifiant la

phosphorylation des AMPARs (Gutlerner et al., 2002). De manière intéressante, la phosphorylation des protéines synaptiques dépend des cycles veille/sommeil, et elle régule la fonction synaptique en modulant la transmission synaptique, la réorganisation du cytosquelette d'actine, des protéines d'échafaudage, la diffusion des récepteurs (Brüning et al., 2019).

#### 1.1.4. La synapse est une structure dynamique

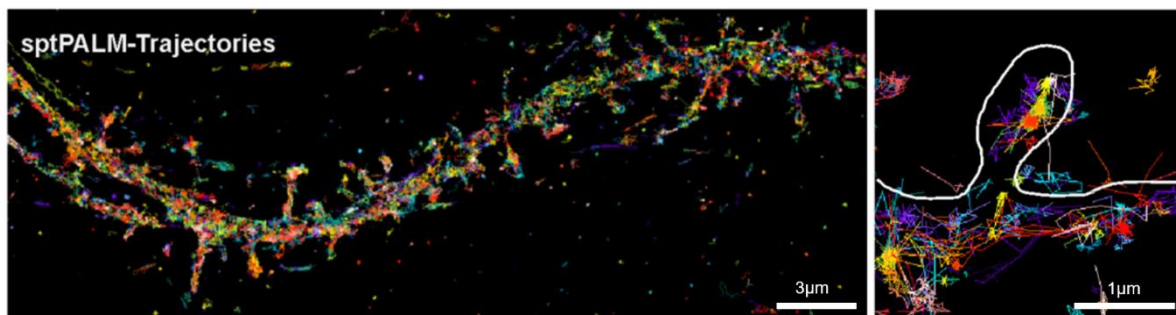
La synapse n'est pas une structure figée mais elle est dynamique. Au niveau de la synapse, les récepteurs sont en mouvement perpétuel via des phénomènes de diffusion des récepteurs à la membrane, ce qui régule la fonction des synapses (Inoue and Okabe, 2003; Choquet and Triller, 2013).



Epine dendritique riche en actine dans laquelle les récepteurs diffusent dans le cytoplasme et à la surface (Choquet and Triller, 2013)



**Les récepteurs AMPA et NMDA sont très dynamiques à la membrane de la synapse**, ces dynamiques sont hétérogènes et les récepteurs entrent et sortent de la synapse par **diffusion latérale** (Triller and Choquet, 2005). Les protéines de liaison des AMPARs, GRIP et PICK1 sont présents au niveau des synapses glutamatergiques et régulent la dynamique et plasticité de la sous-unité GluA2 des AMPAR (Liu and Cull-Candy, 2005). L'activité synaptique répétée induit la perturbation de l'interaction des AMPARs avec GRIP, tandis que PICK médie la libération des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2. Les trajectoires des récepteurs peuvent être suivies par suivi de molécules uniques (ou SPT, Single Particle Tracking) (Bannai et al., 2006; Hoze et al., 2012; Renner et al., 2012; Nair et al., 2013).



Exemples de trajectoires de la sous-unité GluA1 sur une dendrite et au niveau d'une épine dendritique en SPT-PALM. Des nanodomains de GluA1 sont visibles. (Adapté de (Nair et al., 2013)).

En plus de ces processus de diffusion membranaire, les récepteurs peuvent aussi être endocytés, et d'autres réinsérés à la synapse en fonction de l'activité neuronale (Ehlers, 2000).

Les neurones ont donc la capacité de modifier leurs synapses lorsque la neurotransmission est augmentée ou diminuée, au cours du développement ou à des stades matures. Ces altérations consistent en des modifications de la connectivité et de synapses individuelles. Ces phénomènes correspondent à de la plasticité synaptique. La plasticité des synapses permet des **modifications sur le long terme de l'activité des réseaux neuronaux**, comme des mécanismes d'apprentissage et de mémoire. Il existe de multiples types de plasticité. Les mécanismes de **LTP (plasticité à long terme)** dépendante des NMDARs est bien décrite, et des modifications sur le long terme de l'efficacité des synapses est associée au recrutement des AMPARs au niveau postsynaptique (Bliss and Lømo, 1973; Nicoll, 2017; Monday et al., 2018). Les neurones hippocampiques contiennent plus de 10000 synapses « plastiques », ce qui permet de coder des quantités d'informations importantes et appuie les **processus de mémoire** par le stockage de ces informations. L'activation de la CaMKII induit par la LTP permet la phosphorylation de SynGAP, associée aux NMDARs et enrichie aux PSDs, ce qui active la voie de signalisation ERK (Yee et al., 2017). La protéine CREB (cAMP-responsive element-binding protein) est phosphorylée par ce biais, et est capable de modifier l'excitabilité neuronale et favorise les fonctions de mémoire (Lisman et al., 2018). Au cours des processus

de LTP, la phosphorylation de SynGAP par CamKII induit sa dispersion sur l'épine dendritique, ce qui crée un **élargissement de l'épine**, favorise l'insertion des AMPARs et potentialise ainsi la synapse (Araki et al., 2015). Les propriétés dynamiques des AMPARs, mobiles sur de courtes durées, sont en lien avec l'hétérogénéité de la composition des AMPARs à la synapse et pourraient jouer un rôle important dans la modulation de différentes formes de plasticité synaptique (Choquet, 2018).

La LTP est plus complexe que le mécanisme de recrutement des AMPARs activé par l'influx de calcium via les NMDARs et serait aussi contrôlée par une signalisation trans-synaptique. Elle passerait par une **restructuration trans-synaptique** de la synapse, qui permettrait l'augmentation de la réponse des AMPARs à un quantum de libération de glutamate, et qui serait médiée par une série de processus de restructuration de la synapse, constitués de multiples CAMs, pour diriger et coordonner les modifications des compartiments pré- et postsynaptiques. Les ligands de la neurexine, LRRTMs et NL-1 sont requis pour des processus de LTP dépendants des NMDARs dans la région CA1 de l'hippocampe (Jiang et al., 2017; Bhourri et al., 2018; Südhof, 2018).

Les synapses contenant des NMDARs mais pas d'AMPARs fonctionnels sont appelées **synapses silencieuses**. L'expression de ce type de synapses est élevée au cours des phases précoces du développement, pendant lesquelles les NMDARs semblent limiter la présence des AMPARs jusqu'à un signal qui permettra d'activer les synapses par leur recrutement (Kerchner and Nicoll, 2008). L'activité neuronale, et notamment les processus de LTP, permet d'activer les synapses silencieuses, et le BDNF aurait aussi un rôle dans le recrutement des AMPARs aux synapses (Liao et al., 1995; Itami et al., 2003)

L'organisation précise de la synapse glutamatergique permet son fonctionnement et de nombreuses régulations des réseaux neuronaux dans l'hippocampe. La **mise en place de cette organisation** est un processus crucial pour générer des circuits synaptiques fonctionnels et cohérents. Je décrirai dans la prochaine partie les mécanismes de formation et stabilisation des synapses excitatrices (Changeux and Danchin, 1976). L'hypothèse synaptotrophique décrit que les compartiments pré- et postsynaptiques sont dynamiques et que les modifications fines des protéines synaptiques contrôlent l'élaboration des circuits et de leur plasticité (Cline and Haas, 2008).

## 1.2. Synaptogenèse et stabilisation des synapses glutamatergiques

La **synaptogenèse** consiste en la **formation de synapses fonctionnelles**, après la reconnaissance de protéines sur le neurone cible par le cône de croissance axonal et l'interaction adhésive spécifique qui apparie les partenaires synaptiques. De nombreux signaux peuvent induire la formation de synapses dans des circuits neuronaux en développement, parmi eux, les **neurotransmetteurs**, les **molécules d'adhésion cellulaires** et les **neurotrophines**.

### 1.2.1. Différents timings de formation des synapses GABA- ou glutamatergiques

Le GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) est synthétisé par l'action de deux décarboxylases GAD67 et GAD65, mais GAD67 est à l'origine de 90% de la production de GABA (Chattopadhyaya et al., 2007). La synthèse du GABA a lieu bien avant l'établissement des connexions synaptiques. L'activité du réseau module la production de facteurs trophiques comme le BDNF, qui facilite la formation des synapses GABAergiques. Le GABA a des effets trophiques sur la migration neuronale et la croissance axonale, largement expliqués par son action dépolarisante dans les neurones immatures. Celle-ci génère une forme précoce de communication neuronale par des courants calciques qui précède et induit la formation des synapses glutamatergiques (Ben-Ari et al., 2004; Huang and Scheiffele, 2008). Le glutamate a été décrit comme un régulateur du développement des synapses chez les Vertébrés, mais aussi de leur maturation et plasticité.

La synaptogenèse a lieu au cours d'une **fenêtre temporelle périnatale précise**. Dans l'hippocampe au cours du développement, les récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub>, NMDA et AMPA participent **séquentiellement** à l'excitabilité des réseaux neuronaux en formation. Dans le contexte développemental, les concentrations intracellulaires élevées en Cl<sup>-</sup> sont à l'origine de **l'action transitoirement excitatrice du GABA**, via les récepteurs GABA<sub>A</sub>, qui est caractéristique des neurones en développement. L'activation des GABA<sub>A</sub>R dépolarise les neurones ce qui active les canaux ioniques sodiques et calciques. La signalisation glutamatergique est initialement médiée uniquement par les récepteurs NMDA (Durand et al., 1996). Les récepteurs AMPA fonctionnels étant absents des synapses, elles sont silencieuses au potentiel de membrane au repos, les NMDARs étant bloqués par les ions Mg<sup>2+</sup>. Cependant, lorsque le réseau est en activité, l'action excitatrice du **GABA peut faciliter l'activation des NMDARs**. Les AMPARs auront ce rôle plus tard dans la maturation des réseaux, lorsqu'ils seront associés aux NMDARs qui participent à la transmission synaptique et à l'activité du réseau (Ben-Ari et al., 1997). Les circuits GABAergiques se développent avant ceux des neurones pyramidaux glutamatergiques, et les synapses GABAergiques excitatrices sont les premières formées dans l'hippocampe. L'expression du co-transporteur au K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> KCC2 est

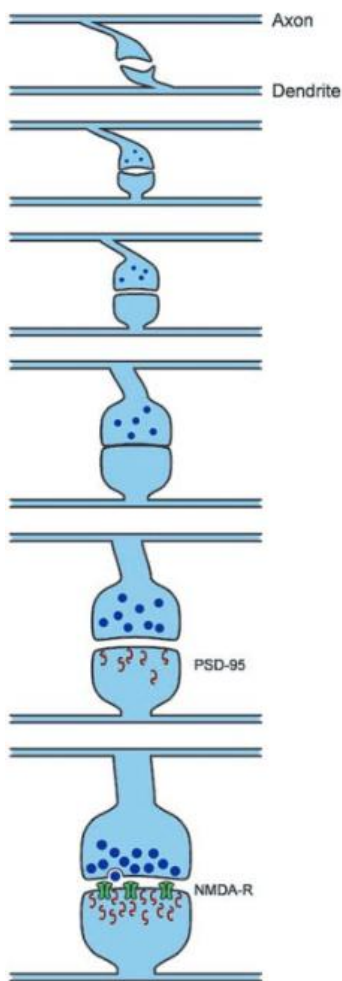
nécessaire pour la transition de l'action du GABA de dépolarisant vers hyperpolarisant dans l'hippocampe. Son expression augmente au cours du développement et réduit fortement la concentration intracellulaire en chlore, ce qui favorise des réponses hyperpolarisantes du GABA (Rivera et al., 1999).

**Les neurotransmetteurs sont impliqués dans la formation des synapses, leur plasticité et le développement des arborisations dendritiques et axonales.** La libération de GABA peut induire la formation de synapses inhibitrices ou excitatrices dans le cortex en développement (Oh et al., 2016). Dans le cortex, la **libération locale de glutamate** est suffisante pour induire la formation rapide d'une épine dendritique. L'activité synaptique peut ainsi moduler la connectivité neuronale. La formation de synapses induite par le glutamate est restreinte à la période de synaptogenèse et nécessite l'activité des NMDARs, et de la PKA (Kwon and Sabatini, 2011). La libération de glutamate peut médier la formation de **filopodes dendritiques**. Les filopodes sont des **protrusions membranaires très motiles** et elles facilitent les contacts entre les axones et les dendrites lors de la synaptogenèse (Fiala et al., 1998).

### **1.2.2. La formation des synapses excitatrices suit un processus précis : pistes des mécanismes de synaptogenèse**

L'agrégation de protéines d'adhésion synaptiques est à l'origine de la formation de synapses naissantes, et le recrutement de récepteurs postsynaptiques spécifiques de certains neurotransmetteurs correspond à un autre stade de stabilisation des synapses (Hua and Smith, 2004). Les phénomènes de formation et d'élimination de synapses peuvent être abordés par la **compréhension des dynamiques de ramification et de remodelage des arborisations axonales et dendritiques en développement** (Alsina et al., 2001).

### 1.2.2.1 Rapprochement et reconnaissance progressive entre l'axone et le neurone cible



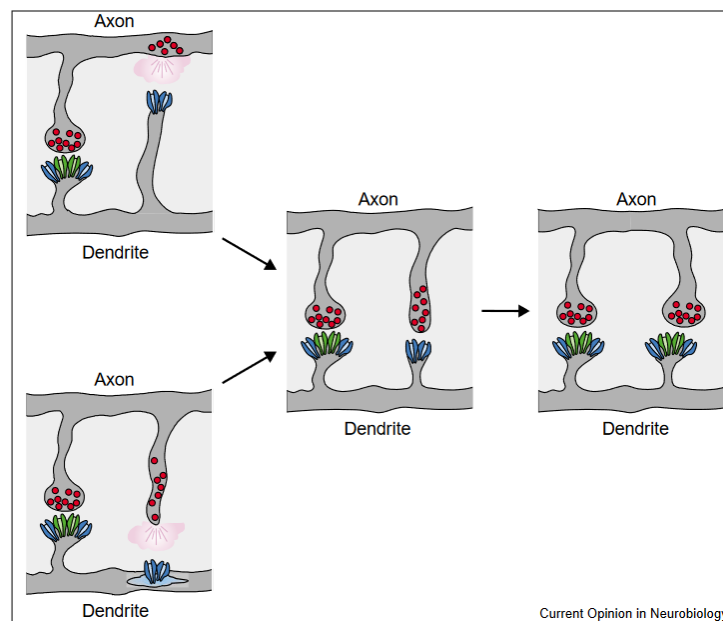
Etapes de la formation  
d'une synapse  
glutamatergique  
(Cohen-Cory et al., 2002)

La synaptogenèse est initiée par l'élongation du cône de croissance axonal ou des filopodes dendritiques. Lorsque le neurone cible a été reconnu, les éléments pré- et postsynaptiques commencent à se différencier. Pour établir les réseaux synaptiques, **des axones en croissance** sont précisément dirigés vers leurs cibles par une multitude de **signaux de guidage** et de reconnaissance entre eux et la cellule cible (Cohen-Cory, 2002). Les axones qui forment les **terminaisons présynaptiques** sont de fines extensions du soma qui n'ont pas d'organelles cellulaires comme le Golgi ou le réticulum endoplasmique. La synthèse protéique dans les axones est possible mais très rare. Toutes les protéines présynaptiques synthétisées sont donc des protéines cytosoliques solubles, et les protéines membranaires et sécrétées doivent être produites dans le soma du neurone et transportées le long de l'axone vers les terminaisons présynaptiques.

Les **filopodes dendritiques** sont de longues protrusions membranaires dynamiques et fines présentes au niveau des neurones au cours des phases précoces du développement. Ils sont cruciaux pour la stabilité et la fonction des circuits neuronaux en formation, notamment les contacts synaptiques excitateurs dans la région CA1 de l'hippocampe. Certaines épines dendritiques se forment directement à partir de filopodes, et dans l'hippocampe, des synapses se développent aussi depuis l'arbre dendritique ou sans filopode intermédiaire (Fiala et al., 1998; Kwon and Sabatini, 2011). Les synapses glutamatergiques sont principalement formées au niveau des épines dendritiques (Prange and Murphy, 2001).

Au niveau de l'axone, il existe des varicosités qui pourraient correspondre à des « présynapses ». Les prolongements dendritiques sont très motiles, et avec la proximité de l'axone se crée un **contact** et la formation d'une synapse. Contrairement à ce qui est décrit usuellement, il ne s'agit pas d'un cône de croissance axonal actif qui initierait la synaptogenèse face à une cible postsynaptique passive. Les filopodes dendritiques sont donc activement impliqués dans **l'initiation de la synaptogenèse**, le **contact initial entre l'axone et la dendrite** (Fiala et al., 1998) et pourrait constituer des précurseurs d'épines dendritiques. De

nombreux contacts axodendritiques ne sont pas suivis de la formation de nouvelles synapses. Les filopodes dendritiques sont très motiles et présentent un fort turnover *in vivo*. En effet, dans le cortex, il a été observé que seulement 15% des filopodes persistaient pendant au moins 4h sous la forme d'une épine, et 13% de ces « synapses » persistent au-delà de 48h (Pan and Gan, 2008). Dans les réseaux matures, la dynamique des filopodes dendritiques n'est pas suffisante pour induire la formation de synapses, et est plutôt représentative d'une connexion synaptique affaiblie. La formation des synapses débute donc avec **le rapprochement des axones vers les dendrites** ou le soma des neurones cibles. Cette interaction est dynamique et implique une **communication à double sens** entre les filopodes axonaux et dendritiques (Jontes et al., 2000; Cohen-Cory, 2002).



Rapprochement des filopodes axonaux ou dendritiques dynamiques à l'origine d'un contact axo-dendritique (Cline, 2001)

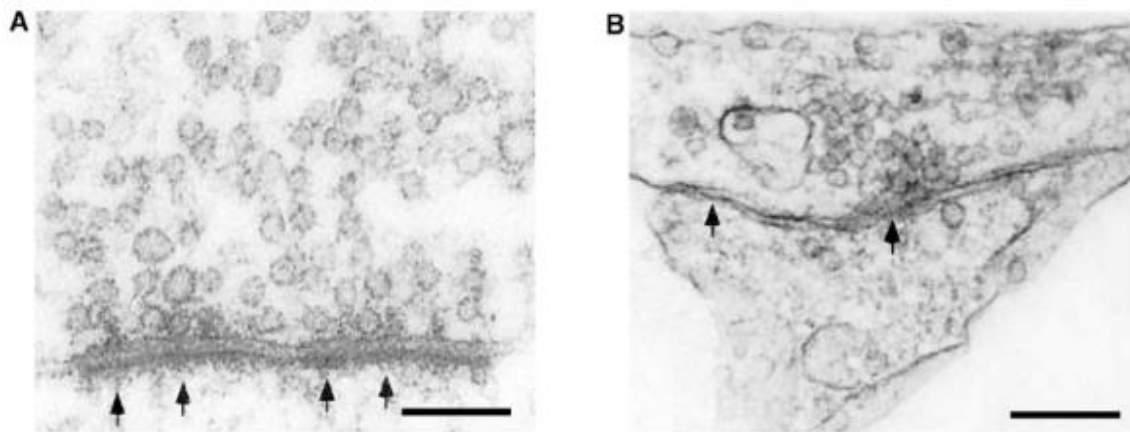
Les filopodes dendritiques sont formés grâce au cytosquelette d'actine et aux protéines Rho. La dynamique des épines dendritique permet de réguler l'efficacité synaptique et de **maintenir la dendrite près de la zone présynaptique** au cours de la synaptogenèse (Bonhoeffer and Yuste, 2002; Yuste and Bonhoeffer, 2004). La **dynamique des filopodes** est activité-dépendante : l'activation des NMDARs favorise la formation des filopodes, tandis que le calcium local stabilise les contacts entre les filopodes et les axones. Les filopodes sont stabilisés par les signalisations liées au calcium, au cytosquelette d'actine modulé par la **signalisation RhoGTPase** et aux interactions neurexine-neuroigine. L'**activité** peut moduler le cytosquelette afin de **stabiliser les prolongements neuronaux** (Hall, 1998). La dynamique des filopodes est aussi régulée par l'**expérience**, qui module la synaptogenèse et le développement des dendrites (Sheng et al., 2018).

**Le nombre de synapses qu'un neurone forme avec d'autres neurones est précisément régulé** (Valdes-Aleman et al., 2021). La formation des synapses glutamatergiques prend quelques heures. Il y a de nombreuses interactions entre les futurs éléments pré- et postsynaptiques (Burry, 1982). L'activité neuronale module les réponses du cône de croissance aux **signaux de guidage répulsifs ou attractifs**. Les sémaphorines ou les éphrines par exemple agissent comme des signaux répulsifs qui limitent la synaptogenèse (Averaimo et al., 2016).

#### **1.2.2.2. Transports de composés pré- et postsynaptiques le long de l'axone et de la dendrite**

Au cours de la formation des synapses, des **changements graduels de la composition moléculaire des synapses** ont lieu, via des processus précis. Des « paquets » de composants présynaptiques préassemblés sont transportés vers la zone présynaptique et les densités postsynaptiques sont remodelées pendant 1-2 heures (Ahmari and Smith, 2002).

La **synapse naissante** est une structure entre le contact neurone-neurone initial et la synapse mature. La balance entre sa **stabilisation ou élimination** est essentielle pour la précision de la mise en place de réseaux neuronaux fonctionnels dans le SNC (Ahmari and Smith, 2002). La redistribution de composants présynaptiques, comme la synapsine I ou la synaptophysine par exemple, d'une localisation diffuse dans l'axone à **des clusters dans la zone présynaptique** peut caractériser une synapse naissante, tandis que la zone postsynaptique varie en fonction de **l'insertion de récepteurs au glutamate**. Certains marqueurs postsynaptiques, comme la protéine PSD-95 ou les récepteurs AMPA, ne sont pas optimaux pour étudier des synapses naissantes car ils ne sont pas recrutés en premier. Au niveau présynaptique, des sondes comme **FM1-43 ou FM1-64** marquent la zone active de recyclage de neurotransmetteurs. Des « paquets » de transports de protéines synaptiques sont visibles, sont marqués par les protéines VAMP (vesicule-associated membrane protein) et indiquent qu'un processus de synaptogenèse est en cours. Au niveau électrophysiologique, les synapses naissantes sont maintenues dans un état « silencieux », qui a une fonction dans le développement des synapses (Kerchner and Nicoll, 2008).



Images en microscopie électronique d'une synapse mature enrichie en vésicules synaptiques et avec une PSD définie (A), ou d'un filopode dendritique apposé de manière discontinue à un axone contenant des vésicules synaptiques, et dont la spécialisation postsynaptique n'est pas certaine, représentatif d'une synapse naissante (B). Barre d'échelle : 200nm (Ahmari and Smith, 2002)

La formation et la maturation des synapses individuelles a lieu en l'espace de jours à semaines mais l'assemblée des synapses glutamatergiques se passe de manière bien plus dynamique, à l'échelle de **quelques heures**. Des boutons présynaptiques fonctionnels peuvent se former en 30 minutes après un contact axodendritique (Friedman et al., 2000) même s'il faudrait 3-4 heures pour qu'une libération des vésicules synaptiques en réponse à une dépolarisation soit possible (Washbourne et al., 2002; Dobie and Craig, 2011).

Dans certains cas, la formation de ces boutons est associée **au recrutement de vésicules synaptiques** issues de boutons synaptiques déjà formés, à proximité. Dans la zone active présynaptique, les sites de libération de neurotransmetteurs sont définis en partie par la protéine Bassoon. L'apparition des composants postsynaptiques SAP90/PSD-95, GluA1 ou NR1 a lieu 45 minutes après. Une synapse glutamatergique individuelle peut donc se former en 1 à 2 heures, et la **formation d'un bouton présynaptique fonctionnel précède souvent la différenciation de la partie postsynaptique dans l'hippocampe**. Il se pourrait donc que des facteurs libérés par le bouton présynaptique induisent l'assemblée de la partie postsynaptique par des signaux antérogrades (Friedman et al., 2000).

Dans le **compartiment présynaptique**, au niveau de la zone active de la synapse glutamatergique, des **vésicules** granuleuses à noyau dense, de 80nm de diamètre au niveau du cône de croissance axonal, qui contiennent notamment syntaxine, SNAP-25, la N-cadhérine sont recrutées au niveau des synapses naissantes. Le réseau de filaments du **cytosquelette associés à la zone active (CAZ)**, l'accumulation de Piccolo et Bassoon et des **vésicules synaptiques (SV)** au niveau de la zone active facilite l'ancrage des SV et leur fusion à la membrane (Zhai et al., 2001).



La **spécialisation postsynaptique** débute par l'accumulation de la **PSD-95 ou de SAP-102**, depuis un pool diffus de protéines, et quelques heures à quelques jours après le contact axodendritique, les **récepteurs glutamatergiques NMDA ou AMPA sont recrutés** depuis des « paquets » de molécules mobiles au sein des dendrites. Ceux-ci sont présents le long des dendrites avant la formation des synapses et contiennent des clusters de sous-unités NR1 mais aussi NR2B des NMDARs. Ils se déplacent le long des microtubules à une vitesse de 4µm/min et sont recrutés aux sites de contact axodendritique en quelques minutes. Les AMPARs sont moins mobiles que les clusters de NMDARs et sont recrutés plus lentement, en 45 minutes (Washbourne et al., 2002). Le recrutement des NMDARs est possible via la signalisation des **neuroligine-1** (Gill et al., 2014). Le recrutement des AMPARs à la synapse est précédé par les NMDARs, ce qui suggère que l'activation des NMDARs induit l'insertion des autres récepteurs au glutamate (Friedman et al., 2000).

De plus, **bloquer les NMDARs au cours des phases précoces de la synaptogenèse** induit une **augmentation significative du nombre de synapses**, de la fréquence des mEPSCs ainsi qu'une arborisation dendritique plus complexe des neurones pyramidaux du CA1. Cette augmentation montre que les NMDARs contrôlent la synaptogenèse, mais qu'il y aurait un mécanisme de formation des synapses indépendant de l'activité des NMDARs (Lüthi et al., 2001). Une autre étude montre que bloquer les NMDARs au cours des stades précoces du développement réduit à la fois le nombre de **prolongements dendritiques et leur longueur**. Bloquer les NMDARs ou AMPARs plus tard dans le développement de ces arborisations modifie uniquement la dynamique des ramifications mais pas leur croissance. En fait, la **transmission synaptique glutamatergique semble dans un premier temps promouvoir la croissance de l'arbre dendritique, puis stabiliser sa structure et les synapses** (Rajan and Cline, 1998).

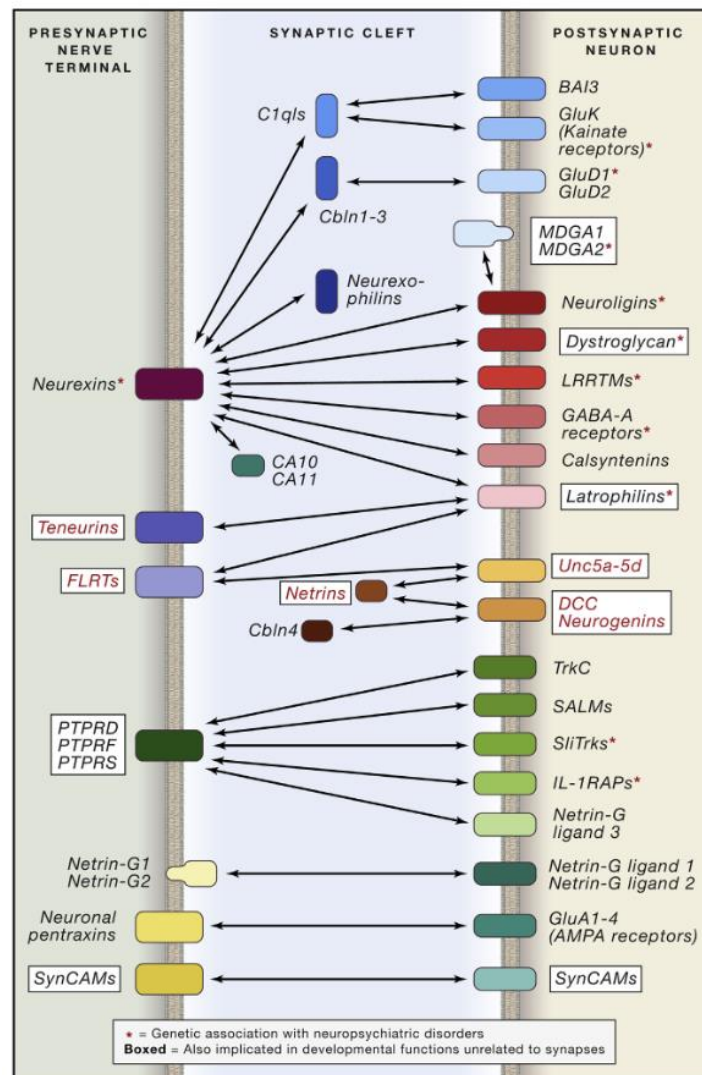
Après le contact axodendritique et l'initiation des différenciations pré- et postsynaptiques spécifiques de la synapse naissante, les compartiments définis sont stabilisés par des CAMs.

### **1.2.2.3. Rôle des CAMs dans les interactions bidirectionnelles à la synapse en développement**

Les CAMs ont un rôle clé dans la synaptogenèse, qui requiert de nombreuses voies de signalisation. Ce rôle est cohérent avec la **localisation des CAMs aux synapses au cours du développement**, et leur interaction physique avec d'autres protéines impliquées dans la synaptogenèse. Les CAMs induisent des spécialisations excitatrices ou inhibitrices mais seulement pré- ou postsynaptiques (Südhof, 2018). L'assemblée coordonnée des

compartiments pré- et postsynaptiques, précisément alignés, serait structurée par des CAMs présynaptiques.

La synaptogenèse est dépendante de signaux médiés notamment par les familles des **neurexines**, des **neuroligines**, des **cadhérines**, des **latrophilines**, et des **éphrines** avec **leurs récepteurs spécifiques** (Sanes and Zipursky, 2020).

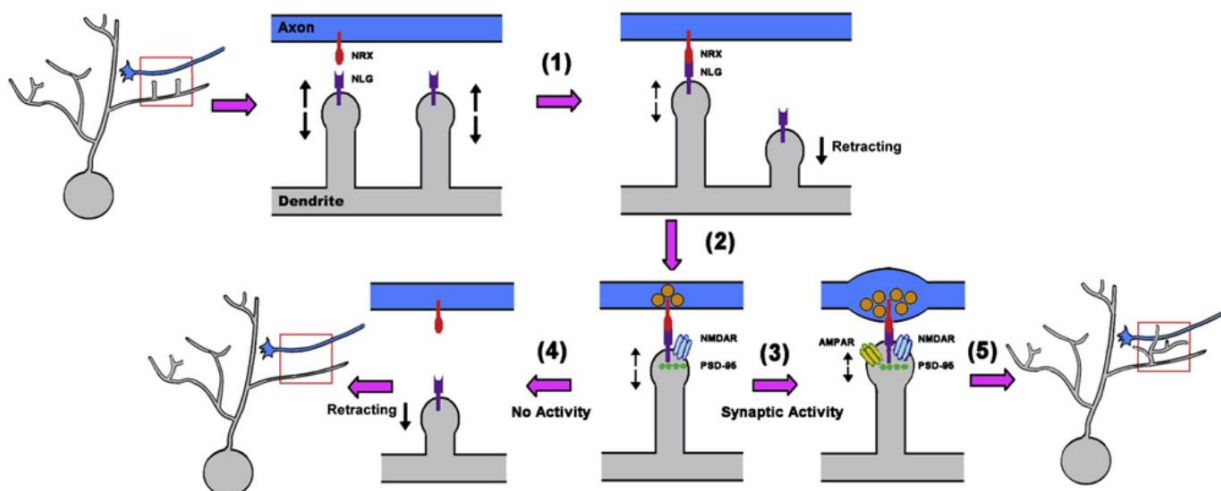


Diversité des CAMs et de leur interactions possibles au niveau de la fente synaptique (Südhof, 2017)

### 1.2.2.3.1. La signalisation neurexine-neuroligine

Le complexe neuroligine-neurexine est un système d'adhésion hétérophilique largement exprimé dans le SNC. **Les neurexines** ont de multiples ligands, comme les neuroligines (NLs) ou les LRRTMs, et elles régulent les propriétés synaptiques. Les NLs induisent la formation des spécialisations présynaptiques glutamatergiques et GABAergiques (Craig and Kang, 2007). NL-1 amplifie spécifiquement la fonction des **synapses excitatrices** en induisant une augmentation du nombre de synapses fonctionnelles et de la transmission synaptique

excitatrice via une signalisation médiée par les NMDARs, tandis que la délétion de NL-2 perturbe la fonction des **synapses inhibitrices**. Paradoxalement, la NL-2 est localisée uniquement aux synapses inhibitrices, mais son ligand a un rôle crucial dans la formation de synapses glutamatergiques, et non inhibitrices, médiée par des astrocytes corticaux (Stogsdill et al., 2017; Südhof, 2018). Les NLs participent donc à la **spécification des synapses** en fonction de l'activité du réseau neuronal (Chubykin et al., 2007). L'interaction trans-synaptique neurexine/neuroligine-1 stabilise les synapses de manière transitoire. Cette stabilisation peut persister si les NMDARs sont actifs (Chen et al., 2010). Les NLs et les neurexines possèdent des **isoformes** qui induisent des interactions trans-synaptiques sélectives et ont donc des fonctions synaptiques variées dans le SNC (Südhof, 2017). **L'épissage** alternatif de la neurexine-1 au niveau de SS4 régule le comportement d'apprentissage par la peur (Boucard et al., 2005; Südhof, 2018). La neurexine-1 peut être modifiée par l'héparane sulfate, ce qui induit une altération de la fonction des synapses et de leur nombre (Südhof, 2018; Zhang et al., 2018)



Modèle d'un rôle des interactions entre neurexines et neuroligines dans la régulation des filopodes dendritiques. L'adhésion créée par cette interaction stabilise la membrane (1), permet le recrutement de PSD-95 et NMDAR (2). L'activité neuronale stabilise le filopode (3), sans activité il se rétracte (4). Le recrutement du cytosquelette d'actine permet la maturation de la synapse (5) (Chen et al., 2010)

#### 1.2.2.3.2. Le rôle des cadhérines

Les **cadhérines (Cdh)** contrôlent les étapes cruciales du développement via des interactions homophiliques bien décrites, dépendantes du calcium (Honig and Shapiro, 2020). Les N-cadhérines (neurales) et E-cadhérines (épithéliales) sont localisées dans les complexes synaptiques, qui sont construits à partir de jonctions d'adhérence. Dans l'hippocampe, N et E-cadhérines sont **présentes au niveau des synapses** mais ne colocalisent pas. Il a été montré que **Cdh8 et 9**, agissant via des **interactions hétérophiliques**, structurent directement les

connexions synaptiques (Südhof, 2018). De plus, les interactions entre les Cdh 6, 9 et 10 sont nécessaires pour des phénomènes de potentiation synaptique et régulent la morphologie des synapses dans la région CA1 de l'hippocampe (Basu et al., 2017).

#### 1.2.2.3.3. Les latrophilines

Les latrophilines sont des RCPGs d'adhésion (Araç et al., 2012) qui se lient spécifiquement aux **téneurines**, **neurexines** et **FLRTs**. La **latrophiline-2** agit comme une CAM postsynaptique, essentielle pour établir et maintenir les synapses. Sa délétion dans les neurones pyramidaux génère une baisse importante du nombre de synapses excitatrices et de la transmission synaptique (Südhof, 2018). **FLRT3** régule la transmission excitatrice et la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe, ce qui indique un rôle de ces protéines dans le développement des synapses glutamatergiques (O'Sullivan et al., 2012). Dans les études de formation de synapses artificielles, les téneurines induisent des spécialisations postsynaptiques et non pré-, ce qui supporte la notion que les teneurines agissent principalement comme des CAMs hétérophiles présynaptiques (Südhof, 2018).

#### 1.2.2.3.4. Autres molécules impliquées dans l'adhésion au niveau des synapses

Les **éphrines** et leurs **récepteurs (EphR)** constituent comme les cadhérines une vaste famille protéique qui a de nombreuses fonctions dans des tissus variés. Un des rôles clés des éphrines et des EphRs est le **guidage axonal**, qui permet la construction des circuits neuronaux (Averaimo et al., 2016). Un récepteur à l'éphrine, EphB2 a été localisé en super-résolution à la jonction postsynaptique, et l'éphrine-B3 recrute la PSD-95 au niveau postsynaptique (Hruska et al., 2015; Perez de Arce et al., 2015). Les éphrines et les EphRs sont donc présents à la synapse. De manière intéressante, la perte des récepteurs postsynaptiques EphBs induit une diminution de la mobilité des filopodes dendritiques, impliqués dans l'initiation de la synaptogenèse. Le rôle synaptogénique des EphBs est restreint à la période de développement où les filopodes sont abondants et très motiles (Kayser et al., 2008).

Des molécules présynaptiques sont ancrées à la terminaison présynaptique par un **récepteur à la pentraxine**. Les **pentraxines** se lient aux AMPARs par des interactions trans-synaptiques qui induisent la spécialisation postsynaptique de la zone. Localiser des AMPARs à la membrane de neurones serait suffisant pour la spécialisation postsynaptique de la membrane et le recrutement de protéines comme PSD-95 ou Homer-1 (Pelkey, 2015; Lee et al., 2017; Van't Spijker et al., 2019), ce qui suggère un rôle des pentraxines dans la formation des synapses glutamatergiques.

Les AMPARs interagissent avec les **pentraxines neuronales**, les LRRTM4 (leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4) qui sont impliquées dans le remodelage des synapses excitatrices (Siddiqui et al., 2013). Les **récepteurs ionotropiques** au glutamate pourraient servir d'adhésion entre pré- et post-synaptique et favoriser la formation des synapses (Fossati and Charrier, 2021).

Les protéines **Slitrk (Slit- and Trk-Like)** qui se lie participent à la formation des synapses excitatrices et inhibitrices. **Slitrk1, 2, 4 et 5** régulent la densité des synapses glutamatergiques, leur suppression induit une réduction du nombre de synapses excitatrices, et leur ligand de la famille des LAR-RPTP (leukocyte antigen-related receptor protein tyrosine phosphatase), **PTP $\sigma$** , est requis pour la différenciation présynaptique excitatrice (Yim et al., 2013).

Les **BAIs (Brain angiogenesis inhibitors)** sont des RCPGs d'adhésion, ayant pour ligands les **C1qls**, qui appartiennent à une famille de protéines sécrétées avec un domaine C1q. Les C1qls se fixent avec haute affinité aux BAIs, et modulent le nombre de synapses dans des cultures de neurones, ce qui associe les BAIs à une fonction synaptique (Bolliger et al., 2011). BAI1, exprimé uniquement par les neurones, serait essentiel dans la formation de synapses et la suppression de BAI1 modifie la plasticité synaptique. De plus, la **phosphatidylsérine** se fixe sur les BAI1 au niveau de cellules apoptotiques, qui sont phagocytées par la suite (Südhof, 2018).

Les **SynCAMs** sont situées dans la zone périssynaptique et contribuent à la plasticité des synapses (Perez de Arce et al., 2015). Elles participeraient à la régulation de la forme des synapses.

Ces données montrent qu'il existe au niveau de la fente synaptique un réseau complexe et divers d'interactions trans-synaptiques.

#### 1.2.2.4. Rôle du BDNF à la synapse

Le **BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)** a un rôle un rôle important dans la mise en place des circuits neuronaux complexes et fonctionnels. Cette neurotrophine (NT) module la ramification des axones et des dendrites, augmente l'efficacité de la transmission synaptique, influence la maturation des synapses et des réseaux neuronaux. Augmenter le niveau de BDNF amplifie significativement l'arborisation des axones et le nombre de synapses (Alsina et al., 2001; Park and Poo, 2013). Les effets synaptiques médiés par les NTs constituent pour la plupart en des **modifications présynaptiques de la libération de neurotransmetteur**. Des cibles identifiées en aval de la signalisation médiée par le BDNF sont des protéines associées aux vésicules synaptiques comme la synapsine, la synaptophysine et la

synaptobrevine. Aux synapses glutamatergiques, le BDNF favorise la transition des synapses immatures ou silencieuses vers des **synapses contenant des AMPARs**.

Les afférences axonales se ramifient progressivement sur les neurones cibles. Dans le système visuel, le BDNF module la constitution et le raffinement des arborisations axonales. L'activité neuronale et le BDNF font partie de mécanismes distincts mais qui convergent et modulent la **complexité des arborisations axonales *in vivo***. L'activité neuronale participe à la stabilisation des prolongements axonaux et le BDNF favorise la croissance de ces axones (Cohen-Cory, 1999).

### 1.2.3. La synaptogenèse est un mécanisme activité-dépendant

**La majorité des processus décrits précédemment dépendent de l'activité.** L'activité joue un rôle crucial dans la libération des neurotransmetteurs, l'activation subséquente de récepteurs postsynaptiques spécifiques et est un signal clé dans la synaptogenèse et la stabilisation des synapses. Les sources d'activité spontanées sont importantes dans de nombreux mécanismes de synaptogenèse avant même que les réseaux soient fonctionnels (Katz and Shatz, 1996).

Au cours du développement, l'activité des réseaux est accrue en réponse à de nombreux stimuli expérimentés pour la première fois, et les circuits neuronaux codent ces informations par la **formation de connexions synaptiques**. L'activité d'un site synaptique peut déstabiliser une synapse peu active à proximité. Les expériences d'Hubel et Weisel sur la ségrégation des colonnes de dominance oculaire au cours de la période postnatale précoce ont souligné **l'importance de l'activité relative des réseaux dans la définition de la connectivité synaptique du SNC** (Hubel et al., 1977).

La **régulation activité-dépendante** de la croissance et l'arborisation axonales ainsi que la formation des synapses sont essentiels au développement de réseaux neuronaux. Au cours du développement, **l'activité synaptique favorise l'émergence de prolongements dendritiques et axonaux**. Ces données suggèrent un lien étroit entre la transmission synaptique, les dynamiques de ramification et le développement de l'arborisation dendritique.

**L'activation des NMDARs par l'activité neuronale** peut promouvoir la **stabilisation** et la maturation des synapses. Elle régule l'organisation du cytosquelette postsynaptique en particulier l'**actine** (Star et al., 2002; Lavoie-Cardinal et al., 2020). L'activation des NMDARs permet le **recrutement des AMPARs à la membrane postsynaptique**. Les synapses silencieuses sont converties en synapses actives par des modifications postsynaptiques, en particulier le recrutement fonctionnel des AMPARs à partir d'un pool intracellulaire diffus. Les synapses matures contenant des AMPARs stabilisent les prolongements sur lesquelles elles

sont formées, qui forment à leur tour de nouveaux prolongements (Zhang and Poo, 2001). La redistribution des AMPARs module les phénomènes de LTP ou LTD (dépression à long terme) qui modifient la fonction synaptique et sont à l'origine des bases de l'apprentissage et de la mémoire (Malinow and Malenka, 2002). L'activation des NMDARs permettrait l'expression de protéines structurelles permettant la maturation des synapses comme CaMKII, induit la synthèse et la libération de neurotrophines, en particulier le BDNF qui favorise la maturation des terminaisons présynaptiques et augmente le nombre de synapses par terminaison axonale (Hua and Smith, 2004).

La fréquence de formation des synapses est régulée par l'activité. Le blocage des NMDARs ralentit l'accumulation de PSD-95 dans des cultures de neurones hippocampiques (Okabe et al., 1999). Au niveau des dendrites, les épines postsynaptiques sont présentes en grand nombre et les structures sont rapprochées, alors que les zones présynaptiques sont uniformément dispersées et réparties sur les axones. Dans les réseaux matures de neurones hippocampiques, le nombre de terminaux présynaptiques est régulé par l'activité synaptique, plus précisément l'activation des AMPARs et l'AMPC, et se trouve donc dans un état d'équilibre dynamique (De Paola et al., 2003).

Cependant, **la synaptogenèse peut avoir lieu en absence d'activité neuronale**. En effet, l'activité n'est pas requise pour les étapes précoces de synaptogenèse, et bloquer la libération de neurotransmetteur *in vivo* n'affecte pas la formation des synapses avant E18. La **suppression de la protéine Munc18-1** dans un modèle murin induit une perte complète de la libération de neurotransmetteur via les vésicules synaptiques au cours du développement, et donc l'absence de transmission synaptique. Cependant, chez les mutants, on observe une mort importante des neurones matures après E18 (Verhage et al., 2000). La libération de glutamate per se ne serait pas nécessaire pour l'assemblée des synapses glutamatergiques, mêmes si de nombreux aspects de la synaptogenèse sont contrôlés par l'activité synaptique (Sando et al., 2017; Sigler et al., 2017). Dans certaines conditions, les étapes initiales de la synaptogenèse ne sont pas liées à l'activité (Craig and Boudin, 2001) mais **la formation des synapses reste en majorité modulée par l'activité neuronale** (De Paola et al., 2003).

Des signaux moléculaires peuvent être à l'origine de **la fin de la synaptogenèse**, et la maturation des synapses. Le monoxyde d'azote (NO) est libéré de manière activité-dépendante et provoque la déstabilisation des cônes de croissance *in vivo*. Le NO pourrait donc être un **signal de déstabilisation de l'arborisation dendritique** (Hua and Smith, 2004). L'expression de la sous-unité NR2A des NMDARs remplaçant NR2B au cours du développement, est suffisante pour limiter le nombre de synapses et arrêter le développement des épines dendritiques (Gambrill and Barria, 2011). Après la formation des synapses, celles-

ci peuvent être stabilisées ou déstabilisées, et elles constituent des structures très dynamiques et plastiques comme décrit dans la partie 1.1.

Les **processus de remodelage des synapses** sont développementaux et dépendants de l'activité du réseau en formation. Les inputs synaptiques coactivés sont sélectivement stabilisés et ceux pour qui l'activité ne coïncide pas sont éliminés. Lorsque la synapse n'est plus fonctionnelle dans le SNC, le **raffinement des réseaux** a lieu via une élimination rapide des synapses, en moins de deux heures (Hopf et al., 2002).

La régulation des synapses glutamatergiques et de leur efficacité passe aussi par des mécanismes impliquant des cellules non-neuronales. Dans cette partie, je discuterai des mécanismes de formation ou stabilisation/déstabilisation des synapses par les **microglies et les astrocytes**, mais aussi de l'importance de **l'élagage synaptique**, un processus crucial pour le modelage des réseaux de neurones en cours de développement. Il consiste en **l'élimination des synapses produites en excès au cours du développement** (Petanjek et al., 2011). Dans un modèle de macaques Rhesus, plus de 500 000 synapses ont été identifiées et analysées dans cinq zones du cortex, moteur, somatosensoriel, préfrontal, visuel et limbique. La densité de synapses augmente rapidement dans les cinq régions du cortex analysées au cours des deux derniers mois de gestation, puis au cours des premiers mois postnataux. Elle diminue ensuite dans toutes ces régions, ce qui est lié aux mécanismes d'élagage synaptique (Rakic et al., 1986). Par exemple, près la période de synaptogenèse dans le cortex des primates non-humains, plus de 40% des synapses formées au cours du développement sont éliminées, soit des milliers par seconde (Bourgeois and Rakic, 1993).

### **1.3. Rôle des cellules microgliales et astrocytaires dans la régulation des synapses au cours du développement**

L'élimination des synapses est un processus crucial pour transformer des circuits neuronaux redondants en circuits concis et opérants. Le **raffinement des circuits neuronaux** au cours du développement a lieu en effet via l'élimination sélective de certaines connexions synaptiques et le renforcement d'autres synapses. Les changements de l'environnement ont une influence certaine sur les circuits en favorisant des mécanismes de compétition et de plasticité cérébrale (Hubel et al., 1977). L'élimination des synapses semble dépendre des patterns d'activité relatifs des synapses environnantes plutôt que de l'activité *per se*. Les synapses actives pourraient donc déstabiliser les synapses inactives via des **signaux intersynaptiques, antérogrades ou rétrogrades**. Les axones sont retirés par un mécanisme en plusieurs étapes, impliquant leur atrophie et rétractation puis la perte du compartiment postsynaptique qui était en contact avec l'axone présynaptique (Riccomagno and Kolodkin,



2015). **Une question demeure : quel compartiment initie l'élagage des synapses ?** (Lichtman and Colman, 2000).

### 1.3.1. L'élagage des synapses est essentiel pour le développement normal du cerveau : territoires microgliaux et astrocytaires

Dans les années 80, Burry développe un modèle de synapses artificielles *in vitro*. Il observe que les éléments « présynaptiques » sont contactés et même entourés par des cellules non-neuronales. Ces cellules présentent des débris indiquant une phagocytose de matériel cellulaire, et suite au contact des cellules non-neuronales, les neurites disparaissent. Les synapses artificielles sont donc phagocytées *in vitro* et *in vivo* par les cellules non-neuronales, qui pourraient éliminer les éléments présynaptiques non fonctionnels. Ces observations suggèrent que **les cellules non-neuronales auraient un rôle central au cours de la synaptogenèse et de l'élagage des synapses** (Burry, 1982).

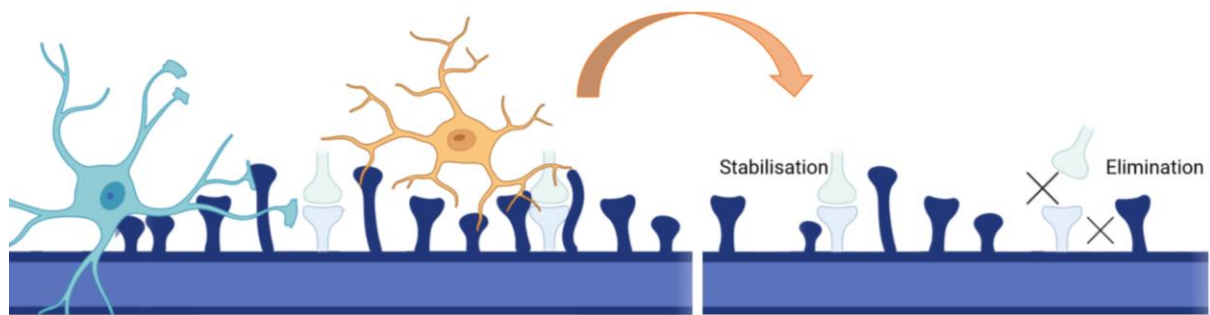


Schéma illustrant les interactions entre les épines dendritiques et les astrocytes (bleu) et les microglies (orange) et leur rôle dans la stabilisation ou l'élimination des synapses au cours du développement postnatal

#### 1.3.1.1. Les microglies modifient la plasticité des synapses par leur motilité et la libération de molécules trophiques

Les microglies sont les cellules immunitaires dans le SNC. Elles représentent environ 10% des cellules du cerveau, (Pessac et al., 2001) leurs progéniteurs proviennent du sac vitellin et envahissent le SNC au cours du développement à partir du jour embryonnaire E9.5 chez la souris (Ginhoux et al., 2010) et de la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'humain (Menassa and Gomez-Nicola, 2018). Au cours de leur développement, les microglies passent d'une morphologie amiboïde à une forme ramifiée avec de nombreux prolongements fins qui sont très motiles au sein des tissus neuronaux (Davalos et al., 2005; Wu et al., 2015). Les prolongements microgliaux sont remodelés par la signalisation purinergique via le **récepteur**

**microglial à l'ATP P2Y12** (Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2007). L'application de NMDA dans des tranches d'hippocampe de souris ou sélectivement au niveau du dendrite d'un neurone individuel génère la croissance des prolongements microgliaux. Cette motilité est due au relargage d'ATP qui est clé dans la communication neurogliale, suite à l'activation des NMDARs (Dissing-Olesen et al., 2014). **La communication neuromicrogliale dépend de la signalisation purinergique et des concentrations extracellulaires en calcium** (Eyo et al., 2015). La morphologie très ramifiée et les mouvements constants des microglies leur confèrent **un rôle dans la surveillance et la maintenance du tissu neuronal et de sa fonction** (Bruce-Keller, 1999; Nimmerjahn et al., 2005; Béchade et al., 2013). Les microglies sont en effet des régulateurs cruciaux du développement et de l'homéostasie du SNC, à travers des interactions neuromicrogliales impliquant le remodelage des circuits neuronaux au cours du développement **par l'élagage des synapses inconsistantes, l'élimination de débris cellulaires et de cellules apoptotiques, la régulation de la neurogenèse ou encore la sécrétion de facteurs trophiques**. Elles maintiennent ainsi l'homéostasie dans le cerveau, et sont impliquées dans de nombreuses pathologies par l'adoption de phénotypes, de signatures transcriptionnelles et de fonctionnements anormaux. Lorsque leurs fonctions trophiques sont altérées, elles peuvent avoir un comportement neurotoxique.

Le développement de la microglie dépend de CSF-1 et son récepteur CSF-1R, qui contrôlent la différenciation et la densité de nombreux macrophages dans le SNC (Elmore et al., 2014; Matcovitch-Natan et al., 2016). CSF-1 est essentiel pour la survie des microglies et leur fonction, ce facteur joue un rôle dans le développement cohérent des circuits neuronaux (Erblich et al., 2011).

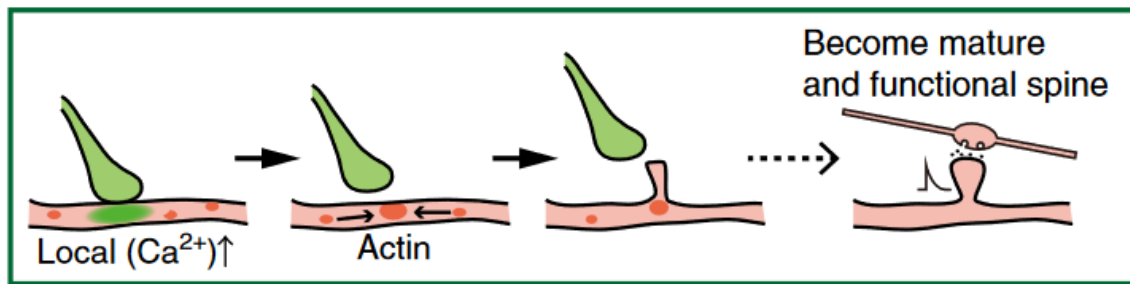
### **1.3.1.2. Les microglies sculptent les circuits neuronaux**

#### **1.3.1.2.1. Formation des synapses médiée par les microglies**

Les microglies sont présentes dans le SNC au stade prénatal mais leur densité augmente au cours des premières semaines postnatales, ce qui est concomitant de la période de synaptogenèse. Les microglies ont un rôle dans la **croissance et la formation des axones** dans le cortex (Squarzoni et al., 2014; Thion et al., 2018).

Au niveau postsynaptique, les microglies contactent les épines dendritiques et induisent parfois la **croissance d'un filopode transitoire**. Les microglies peuvent donc participer aux mécanismes de **formation de synapses**, par le remplacement d'une épine dendritique par une autre plus efficace. Les courants calciques locaux dans les dendrites induits par les contacts microgliaux et l'action du BDNF sont aussi à l'origine de filopodes dendritiques (Weinhard et al., 2018). Dans le cortex somatosensoriel, la microglie contacte les dendrites et induit la formation de filopodes au cours de la période de synaptogenèse, **en réponse à**

**l'expérience sensorielle.** Ce mécanisme pourrait passer par un flux **local de calcium au sein du dendrite et le recrutement du cytosquelette d'actine** (Miyamoto et al., 2016).



Les microglies pourraient induire la formation de synapses : le contact avec la synapse induit des courants calciques, favorisant l'accumulation d'actine et la formation d'un filopode dendritique postsynaptique qui peut trouver un partenaire présynaptique et former une synapse fonctionnelle (Miyamoto et al., 2016)

#### 1.3.1.2.2. Modulation de l'activité des synapses par les microglies

Certains **facteurs trophiques** libérés par les microglies favorisent la survie neuronale et la fonction synaptique (Bessis et al., 2007). Les microglies expriment les récepteurs d'un grand nombre de neurotransmetteurs et elles sécrètent **un large spectre de molécules de signalisation** pouvant réguler l'activité neuronale et la plasticité des synapses, comme des neurotransmetteurs, des cytokines, ou des protéines de la matrice extracellulaire. Par exemple, dans des neurones *in vitro* ou *ex vivo* en présence de **milieu conditionné** par la microglie, l'amplitude et la durée des courants médiés par les NMDARs augmentent. TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), une cytokine sécrétée par les microglies contrôle la fonction et plasticité de la synapse (Béchade et al., 2013). La microglie libère **l'interleukine-10 (IL-10)** qui induit l'augmentation du nombre d'épines dendritiques, de synapses excitatrices et inhibitrices via les récepteurs à l'IL-10 exprimés par les neurones au cours du développement précoce. IL-10 induit donc la formation de synapses et IL-1 $\beta$ , aussi libéré par la microglie et dont les récepteurs sont exprimés par les neurones, bloque ces effets (Lim et al., 2013). Les microglies et les astrocytes sécrètent des **thrombospondines**, une famille de protéines de la matrice extracellulaire capables de moduler la synaptogenèse (Christopherson et al., 2005).

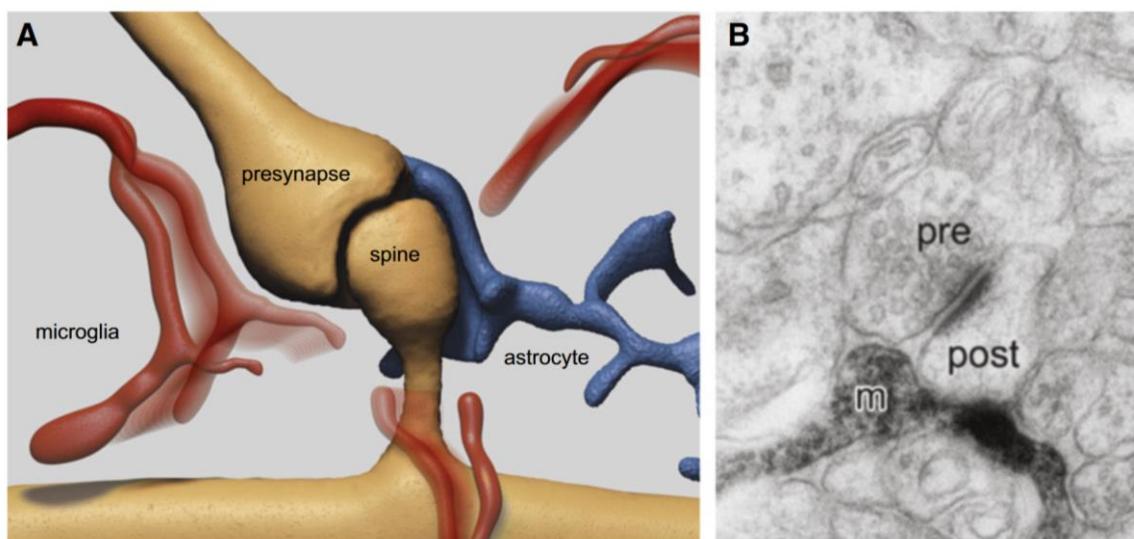
Après stimulation par l'ATP, des **micro-vésicules (MVs)** sont relarguées par les microglies et provoquent l'augmentation significative des mEPSCs dans les neurones, augmentant ainsi la neurotransmission excitatrice. Les MVs agissent principalement sur la partie présynaptique, augmentant le pool de vésicules à libérer (ready releasable pool (RRP)) par un mécanisme dépendant du métabolisme des sphingolipides (Antonucci et al., 2012). L'ATP libéré au niveau

des synapses actives stimule les récepteurs P2X4 microgliaux, ce qui favorise l'attraction des microglies et aussi la production de **BDNF** par les microglies. Le BDNF serait donc libéré localement depuis les prolongements microgliaux vers les synapses en fonction de leur activité et pourrait moduler la formation et la plasticité des synapses (Parkhurst et al., 2013). **KARAP/DAP12**, est un polypeptide associé à des récepteurs à la surface des cellules, exprimé **uniquement par la microglie au cours de la période périnatale** dans le SNC. La perte de fonction de KARAP/DAP12 induit d'importantes altérations de la fonction et plasticité synaptiques. Elle entraîne une baisse significative de l'expression synaptique du récepteur à la tyrosine kinase B (TrkB) liant le BDNF, ainsi qu'une augmentation de la LTP hippocampique due à des modifications des NMDARS (+ de NR2B ou moins de phosphorylation de cette ssu) et AMPARs (les AMPARs comportent moins de GluR2 ce qui augmente leur perméabilité au calcium) (Roumier, 2004).

L'expression de **CX3CR1**, un récepteur à la chimiokine fractalkine (CX3CL1) augmente au cours de la période de formation, maturation et élimination des synapses. Ce récepteur est exprimé uniquement par les microglies dans le SNC et est essentiel à la migration des microglies. La fractalkine a un rôle **chimio-attractif au cours du développement**, permettant de recruter les microglies au niveau des circuits neuronaux (Paolicelli et al., 2014). La signalisation CX3CL1/CX3CR1 **module aussi l'activité synaptique excitatrice** en réduisant l'amplitude des courants EPSC et AMPA (Ragozzino et al., 2006; Piccinin et al., 2010). La déficience de la signalisation fractalkine altère donc les propriétés des microglies et des neurones, ce qui génère un manque de réponse au stress chronique au niveau des réseaux neuronaux ou du comportement. La communication neurogliale via la fractalkine maintient ainsi les microglies dans un état homéostatique (Milior et al., 2016) et régule leur dynamique.

#### **1.3.1.2.3. Elimination des synapses par les microglies au cours du développement du SNC**

Au cours des deux premières semaines postnatales chez la souris, un **remaniement actif des synapses** a lieu et les microglies ont un rôle important dans ce processus (Ransohoff and Stevens, 2011). Les microglies forment des contacts fréquents (1 fois par heure) et transitoires (5minutes) avec les épines dendritiques (Wake et al., 2009; Béchade et al., 2013) et la fréquence de ces contacts est réduite par l'inhibition de l'activité neuronale avec de la tétradotoxine (TTX). Elles passent plus de temps **en contact avec les synapses** en cas de lésion du tissu (1 heure). Les épines dendritiques ont plus de chance d'être éliminées lorsqu'elles ont été contactées par les prolongements des microglies (Tremblay et al., 2010).



Les prolongements microgliaux interagissent avec la synapse tripartite et au niveau pré- et postsynaptique (Kettenmann et al., 2013)

**Les microglies phagocytent activement du matériel synaptique, ce qui participe au phénomène d'élagage synaptique au cours du développement postnatal dans l'hippocampe.** En effet, **du matériel présynaptique, SNAP-25 et postsynaptique, PSD-95, est présent à l'intérieur des microglies.** Lorsque le récepteur microglial à la fractalkine, CX3CR1, n'est pas exprimée dans les microglies, la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux de la région CA1 augmente, ainsi que la fréquence des mEPSCs et le marquage de PSD-95. Chez ces animaux KO pour CX3CR1, il y a un déficit passager de l'élagage synaptique, consécutif à la baisse transitoire de la densité des microglies induite par la mutation. Des mesures électrophysiologiques montrent que la connectivité des réseaux est immature, en lien avec la quantité considérable de synapses en développement présentes, créant de la redondance dans les inputs synaptiques. L'hypothèse retenue dans ce papier est que la fractalkine soluble favoriserait la migration ou la prolifération des microglies au cours du développement, ce qui est vérifié par la densité plus faible de microglies dans la région CA1 de l'hippocampe observée dans les souris KO. La réduction du nombre de microglies est corrélée à une augmentation transitoire de la densité des épines dendritiques, ce qui montre que les microglies sont nécessaires à l'élagage synaptique au cours du développement postnatal dans l'hippocampe (Paolicelli et al., 2011).

Au cours du développement, les processus de reconnaissance et élimination des cellules en apoptose sont importants pour maintenir l'homéostasie et la protection des tissus en réponse à une lésion inflammatoire. Un contact entre le neurone en apoptose et la microglie est nécessaire pour la **reconnaissance d'un signal « eat-me » neuronal** et pour la phagocytose subséquente. La **phagocytose** de neurones apoptotiques **implique une interaction entre la phosphatidylsérine (PS)**, phospholipide exposé rapidement à la surface de la cellule en

apoptose, et **un récepteur à la PS sur la microglie** (Witting et al., 2002). La reconnaissance de la synapse à éliminer pourrait donc passer par l'exposition membranaire de la PS par le neurone. Ce phénomène se produit au niveau des synapses de l'hippocampe et du noyau géniculé latéral dorsal (dLGN), au cours des périodes d'élagage synaptique médiées par les microglies. En bloquant l'exposition de la **PS** avec l'Annexin V, l'élagage des synapses est fortement réduit et la suppression de la protéine microgliale **TREM2** (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) altère aussi ce processus (Scott-Hewitt et al., 2020), qui s'accompagne d'une augmentation de la neurotransmission excitatrice et d'un remaniement de la connectivité neuronale. Le récepteur TREM2 a un rôle crucial dans la **phagocytose des synapses** surnuméraires par les microglies au cours du développement (Filipello et al., 2018). Au cours de l'élimination des synapses, les caspase 2 et 3 sont activées et induisent l'internalisation des AMPARs, ce qui modifie l'activité synaptique. L'activation des caspases peut aussi induire l'externalisation de la PS, et la phagocytose subséquente de la synapse marquée (Faust et al., 2021).

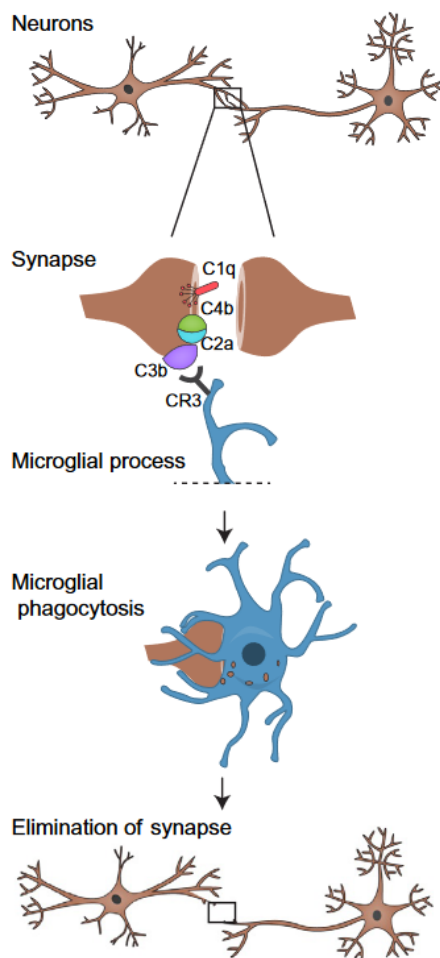
La fractalkine, qui contrôle la fonction des microglies, existe sous forme soluble et ancrée à la membrane du neurone. La **communication neurone-microglie** pourrait donc se faire via un **contact cellulaire** (Paolicelli et al., 2014; Tay et al., 2017). Les neurones et les microglies interagiraient par des **contacts directs** ou des échanges membranaires, ce qui permettrait une régulation rapide de la neurotransmission. Un mécanisme serait que la fractalkine produite par les neurones induit, par la liaison sur les récepteurs CX3CR1, la libération microgliale d'adénosine directement ou d'ATP, rapidement dégradé en adénosine, qui inhiberait en retour la libération présynaptique de glutamate via les récepteurs à l'adénosine A1 (Miyamoto et al., 2013; Sierra et al., 2013; Badimon et al., 2020). Les microglies seraient ainsi capables de **moduler rapidement la fonction synaptique**, et feraient partie d'un mécanisme de communication sélective entre les neurones et les microglies. Il existerait des sous-types de microglies interagissant spécifiquement avec certaines synapses, et qui médieraient leur élimination. Par exemple, un **sous-type de microglies** pouvant fixer le GABA contacte préférentiellement des synapses GABAergiques, et la suppression des récepteurs GABA<sub>B</sub> empêche l'interaction entre ces microglies et les synapses inhibitrices, l'élagage synaptique subséquent et altère la connectivité inhibitrice spécifiquement (Favuzzi et al., 2021).

D'autres types d'interactions entre microglie et synapses ont été montrées dans des cultures organotypiques hippocampiques en développement, comme la « **trogocytose** » des synapses. Cette dernière correspond à une élimination partielle des boutons présynaptiques ou des axones, consistant en une capture rapide (en quelques minutes) des composants de la membrane, d'un diamètre moyen de 250nm, contrairement à la phagocytose qui correspond à l'élimination de structures plus grosses (>1µm) et prend plus d'1 heure (Perry and

Ravichandran, 2017; Weinhard et al., 2018). La trogocytose pourrait être considérée comme un processus de **transfert actif de molécules** transmembranaires (récepteurs, lipides) ou intracellulaires (protéines de voie de signalisation, facteurs de transcription) d'une cellule à une autre (Joly and Hudrisier, 2003).

Dans le dLGN, il existe un mécanisme par lequel une **cytokine exprimée par la microglie, TWEAK** (TNF-associated weak inducer of apoptosis) module la connectivité synaptique au cours du développement **sans phagocytose des synapses**. L'expérience sensorielle favorise l'expression de TWEAK par les microglies. Le récepteur Fn14 (fibroblast growth factor-inducible protein, 14 kDa) de la famille des TNF facilite la formation et maintenance de synapses « bulbeuses » qui renforcent les circuits neuronaux dans le dLGN. Si la cytokine TWEAK est exprimée par une microglie à proximité de la synapse, elle se lie à Fn14 et bloque ses effets. TWEAK induit donc une diminution de l'efficacité et de la densité des épines dendritiques bulbeuses (Cheadle et al., 2020). Dans le cervelet, la microglie médie **indirectement** l'élimination des fibres grimpantes en régulant l'inhibition GABAergique des cellules de Purkinje, mais pas par une phagocytose directe (Nakayama et al., 2018; Faust et al., 2021).

### 1.3.1.3. Le système du complément régule les circuits neuronaux



La signalisation classique du complément induit l'élimination des synapses par les microglies (Presumey et al, 2017)

Les protéines du complément sont exprimées et sécrétées localement, par les cellules neuronales et gliales dans le SNC. La **protéine C1q initiatrice** de la signalisation du complément est une protéine sécrétée composée de trois chaînes de collagène A, B et C, et associée à C1r et C1s. C1q se fixe et recouvre les cellules apoptotiques, les pathogènes ou les débris, et initie une cascade de protéases qui dégradent successivement des composants du complément, induisant le dépôt de la protéine C3. Le clivage de C3 produit iC3b, qui recouvre la membrane de la cellule ou synapse à éliminer pour favoriser sa reconnaissance par les phagocytes. Cette opsonisation des structures à éliminer est appelée « tag ». Les microglies sont le seul type cellulaire exprimant CR3, le récepteur pour C3 (Thion and Garel, 2018). *In fine*, les protéines C3a et C5a formées sont à l'origine de signaux chimiotactiques tandis que la protéine C3b induit la phagocytose de la cellule ou synapse marquées. La protéine C1q a été observée au niveau présynaptique dans le dLGN, où elle serait sécrétée (Perry and O'Connor, 2008).

Les **pentraxines neuronales** (NP1 et NP2/NARP) sont sécrétées au niveau des synapses et interagissent avec C1q, via leur domaine C-terminal (Kovács et al., 2021). Ces protéines pourraient donc participer à la localisation et la fonction synaptique de C1q en tant que **récepteur** pour C1q. La suppression des pentraxines ou de C1q entraîne des altérations dans l'organisation du dLGN au cours du développement.

Dans un modèle murin dépourvu de C1q, une exposition présynaptique élevée de PS est observée, associée à une augmentation de PS phagocytée par les microglies, ainsi que des altérations dans le raffinement des connexions synaptiques dans le dLGN (Scott-Hewitt et al., 2020). Une autre protéine se liant à C1q au niveau de la synapse est la protéine à prion PrP<sup>C</sup> (Sim et al., 2007). **C1q fait ainsi partie d'un mécanisme d'élagage synaptique médié par**



## **les microglies et associé à l'expression neuronale de PS au cours du développement du SNC.**

C1q est donc la protéine initiatrice de la cascade classique du complément et **C3** est une **protéine centrale** dans cette signalisation. Leur expression est élevée dans le cerveau en développement et elles sont **localisées au niveau des synapses immatures** et nécessaires pour l'élagage synaptique dans le dLGN. Les prolongements des microglies sont très dynamiques et ils sont associés régulièrement aux épines dendritiques en fonction de l'activité de celles-ci (Wake et al., 2009; Tremblay et al., 2011). Dans ce système, la phagocytose des synapses dépend de la protéine C3 du complément. De manière intéressante, la suppression de l'expression de C1q, C3, C4 ou CR3 induit des conséquences similaires, i.e. une diminution de l'élimination des synapses et des altérations de la connectivité neuronale qui persistent chez l'adulte (Schafer et al., 2012). Dans le dLGN en développement, le CR3 microglial et son ligand C3, colocalisé avec des marqueurs pré- et postsynaptiques constituent un mécanisme moléculaire clé dans le processus d'élagage synaptique. **Les synapses à éliminer seraient « tagguées » avec la protéine C3 active (iC3b), reconnues par CR3 et phagocytées par les microglies** (Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012).

En aval de cette signalisation, la protéine C1q est colocalisée avec des molécules du complexe **majeur d'histocompatibilité de classe 1 (MHC1)** exprimées par les neurones, au niveau des synapses. Ces molécules du MHC1 pourrait aussi jouer un rôle dans l'élagage des synapses médié par les microglies (Huh et al., 2000; Schafer et al., 2012).

Dans le modèle proposé, les synapses actives et efficaces pour induire des réponses postsynaptiques peuvent médier l'élimination de synapses environnantes moins actives par des signaux favorisant leur reconnaissance et élagage par les microglies, comme C1q ou C3b, et des **signaux pour maintenir les synapses actives, comme par exemple des inhibiteurs endogènes du complément ou d'autres protéines associées aux synapses** (Lichtman and Colman, 2000; Hua and Smith, 2004). Dans le dLGN, la **suppression de CD47**, une protéine transmembranaire qui inhibe la phagocytose en se liant à son **récepteur microglial SIRP $\alpha$** , induit un élagage excessif des synapses. Dans ce cas, les microglies ne phagocytent pas préférentiellement les synapses les moins actives. L'expression de CD47 et SIRP $\alpha$  est accrue au cours du développement et leur interaction fonctionnelle empêche donc une phagocytose aberrante des synapses. **CD47 est localisée préférentiellement aux synapses actives et pourrait ainsi protéger certaines populations de synapses** d'une élimination par les microglies (Lehrman et al., 2018).

La protéine **SRPX2 (sushi repeat protein X-linked 2)** est endogène et sécrétée par les neurones. Elle induit une hausse de la densité de synapses glutamatergiques. Cette action

sur la neurotransmission excitatrice s'explique par la liaison de SRXP2 directement sur C1q, qui inhibe le système du complément et protège les synapses de l'élimination (Cong et al., 2020). Il existe aussi chez l'humain, mais pas la souris, un anticorps C1qNb75 bloquant la fixation de C1q sur les immunoglobulines G ou M, empêchant l'activation de la cascade du complément (Laursen et al., 2020)

#### 1.3.1.4. Rôle de l'activité neuronale dans l'élimination des synapses

Les microglies régulent l'activité neuronale et la plasticité synaptique (Béchade et al., 2013). Dans le dLGN en développement, les microglies phagocytent préférentiellement les synapses moins actives, montrant que ce processus est régulé par **l'activité neuronale**. La protéine **C3 activée (iC3b/C3b) marque sélectivement les synapses peu actives** et déclenche une signalisation avec le CR3 microglial pour éliminer ces synapses (Schafer et al., 2012).

Dans un modèle *in vivo* chez le poisson-zèbre, l'activité neuronale favorise le contact des prolongements microgliaux avec les neurones. Les microglies contactent les neurones les plus actifs, migrent et ensèrent les **synapses actives, marquées d'un signal « find-me » libéré via les canaux pannexin-1 neuronaux, probablement l'ATP, qui agit sur les récepteurs P2 microgliaux**. Ces contacts entre microglie et synapses actives induisent des modifications du cytosquelette microglial médiées par Rac et une diminution rapide des fréquence et amplitude des courants calciques. **L'activité neuronale a donc un rôle instructif sur la motilité des microglies** (Li et al., 2012).

La **communication neurone-microglie est bidirectionnelle** : les neurones peuvent réguler l'activité des microglies et celles-ci peuvent moduler les propriétés synaptiques des neurones. Au niveau d'une synapse active, de **l'ATP est libéré par le neurone** et par les astrocytes environnants. Les prolongements des **microglies sont recrutées** au site d'activité. L'ATP extracellulaire est hydrolysé en adénosine (voir Partie 2.) et l'adénosine active les récepteurs à l'adénosine A1, qui inhibent la neurotransmission excitatrice, régulant ainsi l'activité neuronale locale (Pascual et al., 2012; Badimon et al., 2020; Corsi et al., 2022).

La surproduction de synapses et leur élimination par des mécanismes activité- ou expérience-dépendant comme illustré précédemment sont des processus cruciaux pour la formation des circuits neuronaux au cours du développement. Dans l'hippocampe, il a été montré que l'induction de dépression à long terme peut être à l'origine du raffinement des connexions synaptiques et induire un remodelage des épines dendritiques. Dans l'hippocampe, la taille des synapses est réduite et les compartiments pré- et postsynaptiques sont séparés après LTD (Bastrikova et al., 2008).

Dans l'**hippocampe adulte**, les microglies éliminent des composants synaptiques, et médient ainsi les processus d'oubli. La signalisation du **complément dépendante de C1q** ainsi que l'activité synaptique sont aussi impliquées dans l'élimination des synapses chez l'adulte. Ces mécanismes correspondent donc à ceux en place dans le cerveau en développement (Wang et al., 2020).

Dans le **cerveau adulte**, les contacts des synapses par les microglies ont lieu et peuvent contribuer à l'élimination des synapses par un mécanisme de « **synaptic stripping** » qui consiste en la séparation des terminaisons axonales et du neurone postsynaptique (Trapp et al., 2007; Kettenmann et al., 2013). Les microglies remodelent aussi la matrice extracellulaire, via la **sécrétion de protéases** (cathepsines ou métalloprotéases) et d'activateurs tissulaires du plasminogène. L'espace extracellulaire associé aux microglies est modifié, ce qui permet de moduler la motilité des microglies (Tremblay et al., 2010, 2011).

Chez l'adulte, l'ablation de la microglie ou du BDNF spécifiquement dans la microglie induit des déficits dans l'apprentissage de tâches motrices et réduit la formation des synapses induite par l'apprentissage de ces tâches. Il se pourrait que la fonction principale des microglies dans le cerveau mature soit la **régulation de la formation des épines dendritiques plutôt que l'élimination des synapses préexistantes**. Le BDNF serait sécrété au niveau des prolongements des microglies et pourrait réguler de groupes de connexions synaptiques impliquées dans une tâche d'apprentissage précise (Parkhurst et al., 2013).

Une fois le réseau établi, dans le dLGN, les prolongements des microglies contactent différents types d'éléments synaptiques comme les épines dendritiques, les axones, les prolongements des astrocytes pérисynaptiques et les fentes synaptiques. Les microglies modulent leur comportement et le mode d'interaction avec les synapses **en fonction de l'expérience sensorielle**. En particulier, elles se localisent à proximité des épines dendritiques dynamiques et transitoires, autour desquelles elles régulent l'espace extracellulaire pérисynaptique et la phagocytose des éléments synaptiques. La phagocytose observée dans cette étude implique une endocytose des éléments synaptiques médiée par la clathrine et montre qu'un rôle expérience-dépendant des microglies dans le raffinement des connexions neuronales est présent dans des **réseaux matures** (Tremblay et al., 2010).

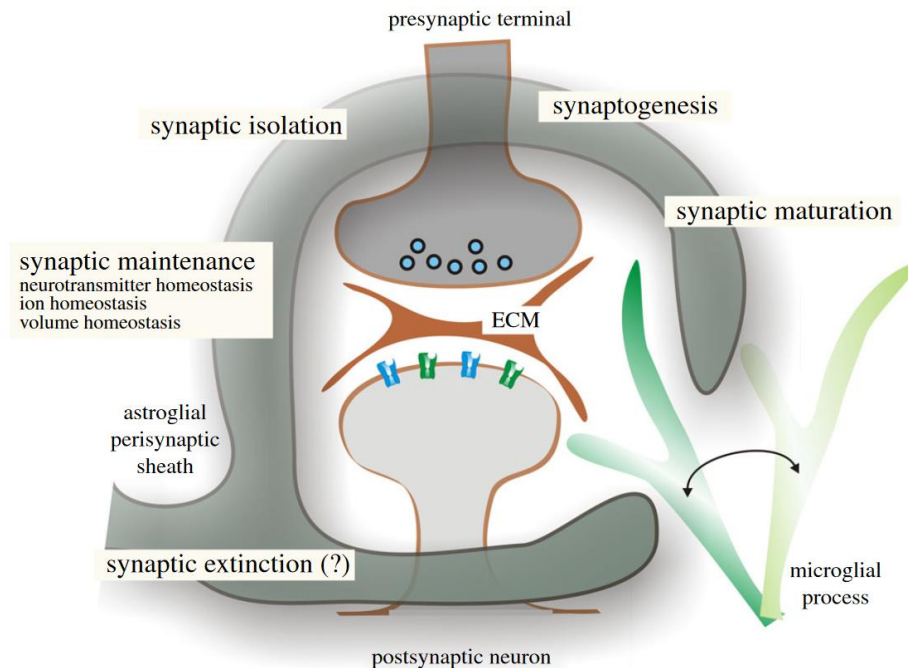
Mécanismes de régulation des synapses glutamatergiques	Protéines impliquées	Temporalité	Durée
Phagocytose	CX3CR1/Fractalkine C1q, C3/CR3 C1q+PS MHC1, C1q	Réseau en développement	1-2 heure
Protection contre la phagocytose	SRPX2 CD47/SIRP $\alpha$	Réseau en développement	-
Trogocytose	PS ?	Réseau en développement	Quelques minutes
Phagocytose et rôle de l'expérience	C1q Clathrine (endocytose)	Réseau mature	1-2 heure
Indépendant de la phagocytose	TWEAK	Réseau mature	-
« Stripping » synaptique	Cathepsines ou métalloprotéases	Réseau mature	-

Tableau récapitulatif des mécanismes de régulation des synapses par les microglies au cours du développement ou chez l'adulte

Il est important de noter qu'il y a des **différences entre les cellules gliales chez les mâles et les femelles**. Les densités de microglie sont différentes : tandis que les rats mâles ont plus de microglies que les femelles dans les régions CA2, CA3 et DG de l'hippocampe à P4, les femelles ont plus de microglies que les mâles à P30 ou P60 (Schwarz et al., 2012). Chez des souris C57Bl6/J adultes ou âgées, les femelles ont 25-40% fois plus d'astrocytes et de microglies dans le DG et CA1 de l'hippocampe que les mâles (Mouton et al., 2002). Les réponses au stress varient aussi, en lien avec les régulations hormonales différentes chez les femelles ou les mâles (Tay et al., 2017).

### 1.3.1.5. Les astrocytes maintiennent l'homéostasie des réseaux neuronaux dans le SNC

Les synapses sont contactées par des prolongements astrocytaires, qui forment avec les compartiments pré- et postsynaptiques une synapse tripartite (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009).



Les multiples fonctions des astrocytes à la synapse (Verkhratsky and Nedergaard, 2014)

#### 1.3.1.5.1. Les astrocytes modulent l'activité des synapses et leur formation

Les astrocytes jouent un rôle actif et important dans la régulation de la transmission synaptique (Pantier et al., 2011; Papouin et al., 2017). Ils peuvent capter l'activité synaptique par des récepteurs au glutamate et modifier les concentrations de calcium intracellulaire afin de libérer des gliotransmetteurs comme du **glutamate**, du **GABA**, de la **D-serine** ou de l'**ATP**, molécules qui modulent la transmission synaptique et l'activité neuronale (Chen, 2005; Araque et al., 2014; Murphy-Royal et al., 2017). Les astrocytes régulent aussi la formation des synapses glutamatergiques, par contact direct ou via la libération de facteurs solubles (Ullian et al., 2001). Par exemple, le **cholestérol**, synthétisé par les astrocytes, amplifie la fonction présynaptique du neurone. La sécrétion de **thrombospondines** par les astrocytes participe aussi à la synaptogenèse (Christopherson et al., 2005; Mazur et al., 2021) ainsi que l'**hévine** qui modulent les AMPARs aux synapses (Kucukdereli et al., 2011). D'autres facteurs dérivés des astrocytes régulent la localisation des AMPARs aux terminaisons postsynaptiques, comme les **sulfates d'héparane Gpc4 et 6** (proteoglycans glypican 4 and 6) qui favorisent le recrutement des AMPARs riches en GluA1 aux sites synaptiques naissants, facilitant ainsi le

recrutement des protéines de la PSD, et la fonction de la synapse (Kamimura and Maeda, 2021). La libération de **TNF- $\alpha$**  par les astrocytes accroît les niveaux d'AMPARs aux synapses (Pickering et al., 2005). Les astrocytes en **contact** avec les synapses excitatrices ou inhibitrices peuvent moduler la synaptogenèse via des  **$\gamma$ -protocadhérines**, complexes d'adhésion cellulaire, exprimées par les astrocytes et les neurones (Garrett and Weiner, 2009).

**Les astrocytes sont la source principale d'ATP.** L'ATP libéré par les astrocytes peut aussi être hydrolysé en adénosine et agir sur les récepteurs A1 présynaptiques (réduisant la neurotransmission excitatrice), coordonnant les réseaux neuronaux (Pascual et al., 2005) (voir partie 2.).

Un modèle de **communication bidirectionnelle entre les synapses et les astrocytes** pérисynaptique est décrit dans l'hippocampe, et implique les **éphrines et leurs récepteurs**. Les EphRs sont des récepteurs à tyrosine kinase associés à la membrane. Les éphrines sont impliquées dans de nombreux processus comme l'embryogenèse, la croissance et le guidage axonaux, mais aussi des modifications structurelles et moléculaires des synapses excitatrices et des cellules gliales voisines. Les éphrines et leurs récepteurs sont localisés au niveau des terminaisons synaptiques dans les neurones de l'hippocampe et du cortex, et aussi dans les prolongements astrocytaires pérисynaptiques. Au niveau de la synapse, EphA4 active l'expression d'éphrine-A3 par les astrocytes pérисynaptiques, ce qui inhibe la recapture de glutamate par les astrocytes et facilite la neurotransmission excitatrice. Cette signalisation module aussi l'expression de la sous-unité GluA1 des AMPARs (Murai and Pasquale, 2011).

#### **1.3.1.5.2. Les astrocytes participent à l'élimination des synapses**

Les microglies sont associées aux neurones et aux astrocytes (Jinno et al., 2007; Trapp et al., 2007; Kettenmann et al., 2013). De manière intéressante, les astrocytes sont la source principale de **CSF-1**, chimiokine essentielle pour la prolifération des microglies (Théry et al., 1992). Les astrocytes et la microglie interagissent avec les neurones apoptotiques de manière synchrone et organisée. Les **prolongements astrocytaires phagocytent** rapidement des petits corps dendritiques apoptotiques diffus tandis que les microglies migrent et entourent le soma et les dendrites apicales. Ces différences de comportements phagocytaires sont malléables et contrôlées par le récepteur à tyrosine kinase *Mertk* (Damisah et al., 2020). **Un astrocyte humain peut contacter jusqu'à 2 millions de synapses** (Allen and Eroglu, 2017). Au cours du développement, la taille du domaine astrocytaire augmente ainsi que le nombre de synapses contactées, ce qui suggère un rôle essentiel des astrocytes dans la régulation de la formation ou élimination des synapses (Morel et al., 2014; Gavrillov et al., 2018). **La fenêtre temporelle** dans laquelle les synapses sont éliminées au cours du développement est

contrôlée par les **astrocytes** immatures, qui créent un environnement permissif pour les mécanismes activité-dépendants qui régulent les synapses à maintenir ou éliminer (Schafer et al., 2012).

**Les astrocytes sécrètent IL-33**, une cytokine impliquée dans le maintien de l'homéostasie du SNC en développement. IL-33 facilite la phagocytose des synapses par les microglies (Vainchtein et al., 2018).

**L'activation des microglies par des LPS**, des lipides complexes qui induisent une réponse inflammatoire, **favorise la production d'ATP microglial, qui permet le recrutement des astrocytes, l'activation des P2Y1Rs astrocytaires**. Les astrocytes libèrent à leur tour de l'ATP, recrutant ainsi d'autres astrocytes produisant de l'ATP et du glutamate. Le glutamate libéré par les astrocytes active les récepteurs métabotropiques neuronaux, notamment mGluR5, ce qui facilite la neurotransmission excitatrice. La description de ce mécanisme met en avant une coopération entre les microglies et les astrocytes pour moduler l'activité neuronale (Pascual et al., 2012).

Les astrocytes médient aussi directement l'élimination des synapses excitatrices et inhibitrices dans le SNC en développement par des mécanismes activité-dépendants, impliquant les voies de **signalisation phagocytaires MEGF10 et MERTK**. MEG10 et MERTK reconnaissent les signaux « eat-me » comme la phosphatidylsérine présente à la surface des cellules ou débris à éliminer (Chung et al., 2013). L'élagage des synapses au cours du développement peut donc dépendre de l'activité phagocytaire des astrocytes, qui régule de nombreuses voies chez l'adulte (Lee et al., 2021).

Les astrocytes et microglies médient donc les processus d'élimination des synapses au cours du développement, et peuvent modifier la structure et l'activité des synapses.

### 1.3.2. Des altérations dans l'élimination des synapses à l'origine de nombreuses pathologies

L'élimination contrôlée des synapses au cours du développement est un processus crucial dans la mise en place et l'homéostasie des réseaux neuronaux (Filipello et al., 2018).

Des **dysfonctions de la microglie affectent le développement du cerveau**. La suppression des microglies dans le SNC ou la délétion du BDNF produit par les microglies induisent des déficits cognitifs (Tay et al., 2017). La perte de la **signalisation fractalkine** dans les modèles knock-out CX3CR1 provoque une hyperconnectivité excitatrice transitoire, suivie d'une baisse de la connectivité fonctionnelle chez l'adulte. Une élimination insuffisante des synapses au cours de la fenêtre temporelle de développement empêche donc le renforcement correct des connexions synaptiques (Zhan et al., 2014). Supprimer l'expression de **TREM2 dans les microglies** induit des défauts d'élagage synaptique, et une hypoconnectivité des circuits neuronaux, qui peut être à l'origine de maladies neurodéveloppementales comme les troubles du spectre autistique (TSA) (Filipello et al., 2018). Dans ces troubles neurodéveloppementaux, la formation, la fonction et le remodelage des synapses sont altérés. Des mutations de facteurs astrocytaires régulant la synaptogenèse ont été trouvées dans des TSA. Les interactions entre les prolongements astrocytaires et les synapses sont donc perturbées dans les troubles neurodéveloppementaux (Allen and Eroglu, 2017).

Des **altérations du système du complément**, qui est impliqué dans l'élagage synaptique, ont été associées à la schizophrénie (Druart and Le Magueresse, 2019). La surexpression de la protéine C4 dans le cortex préfrontal en développement induit une hypoconnectivité des réseaux neuronaux liée aux perturbations de la croissance des épines dendritiques et à une élimination accrue de synapses par les microglies. Ces altérations affectent les comportements sociaux des jeunes et adultes, et peuvent être corrélés à la schizophrénie (Comer et al., 2020). A l'inverse, dans un modèle de knock-out de C1q, la densité accrue des terminaisons axonales dans la couche V des neurones pyramidaux du cortex est associée à une connectivité synaptique excitatrice anormale, et des crises d'épilepsie (Chu et al., 2010). Des défauts dans l'élimination des synapses au cours du développement induisent des densités élevées de synapses et des altérations des circuits neuronaux « hyperconnectés ».

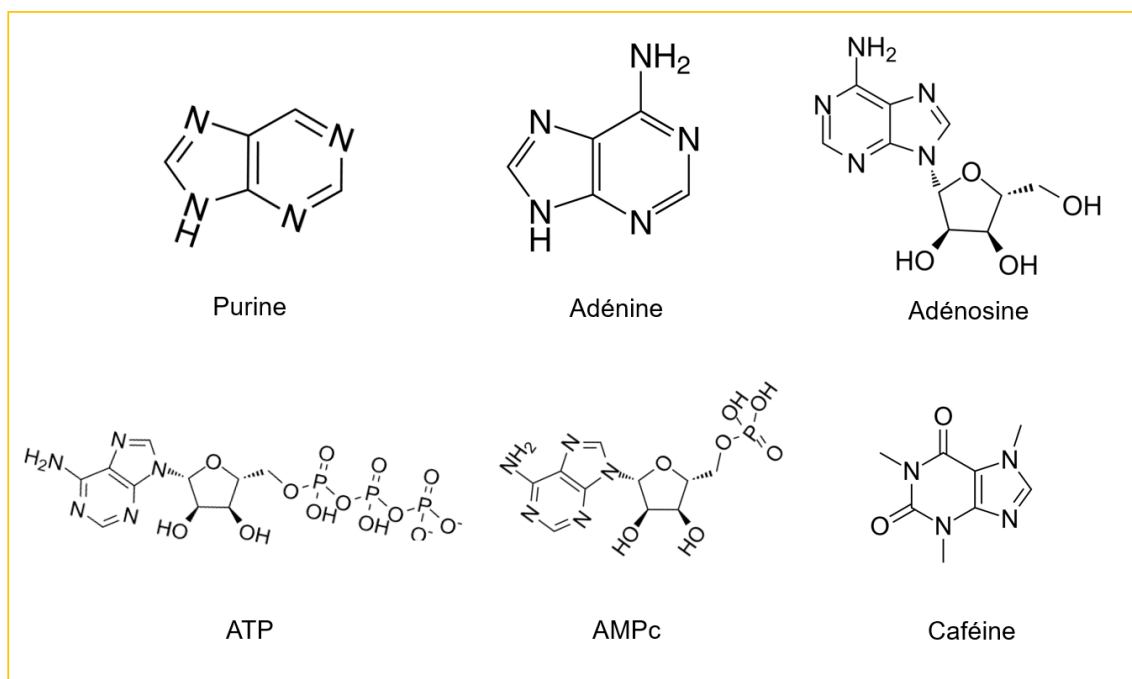
Une expression accrue du complément a aussi été décrite dans des contextes de neurodégénération. La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme la plus répandue des démences, et affecte plus de 40 millions de personnes dans le monde. Dans l'hippocampe, en post-mortem, les signes moléculaires pathologiques de la MA sont l'accumulation de dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes- $\beta$  ( $A\beta$ ), et l'accumulation intraneuronale de protéines tau anormalement hyperphosphorylées dans des enchevêtrements neurofibrillaires. Les



**dépôts de A $\beta$  se lient à C1q et C3b/iC3b** et activent les voies du complément (Druart and Le Magueresse, 2019). Dans un modèle de glaucome, une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine, C1q est surexprimée et l'élagage synaptique accru (Stevens et al., 2007). Dans un modèle de tauopathie, des protéines des PSDs ainsi que du cytosquelette d'actine sont dérégulées, ce qui induit une perte des épines dendritiques. La protéine C1q est accumulée au niveau des PSDs, et ce phénotype est associé à une élimination accrue des synapses par les microglies. Un anticorps bloquant C1q réduit cette phagocytose excessive et restaure ainsi le nombre de synapses, ce qui a un effet neuroprotecteur et représente un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement de ce trouble de neurodégénérescence (Dejanovic et al., 2018). Ces phénomènes d'élimination excessive de synapses dus à l'expression accrue de C1q en dehors de la période de développement sont pathologiques et appuient donc l'hypothèse d'un retour à un état « immature » du réseau qui perturberait son fonctionnement normal.

## 2. Signalisations purinergique et adénoenergique dans la communication intercellulaire, le développement des circuits neuronaux et la maturation des synapses

La structure des **purines** a été décrite par Emil Fischer, qui obtint le prix Nobel de Chimie en 1902 (Fischer, 1902). La structure chimique d'une purine consiste en un cycle pyrimidine associé à un cycle imidazole. Ces composés organiques azotés hétérocycliques sont des **molécules fondamentales en biologie** car elles sont à l'origine de bases azotées composant l'ADN, l'adénine et la guanine (Abbracchio et al., 2009). D'autres purines essentielles au fonctionnement physiologique du vivant sont l'**adénosine**, comprenant une molécule d'adénine liée à un ribose, l'**adénosine triphosphate (ATP)**, utilisé comme source d'énergie cellulaire, l'**adénosine monophosphate cyclique (AMPC)**, qui a un rôle clé dans la régulation des voies de signalisation intracellulaires, mais aussi la **caféine**, qui appartient à la famille des méthylxanthines. Les méthylxanthines sont les composés actifs des xanthines, des molécules naturelles appartenant à la famille des purines, produites par les plantes et les animaux. Les effets psychoactifs médiés par la consommation de cacao, de café ou de thé résultent du blocage des récepteurs à l'adénosine par les méthylxanthines (Franco et al., 2013).



Structures chimiques de purines importantes

Ces purines régulent de nombreuses fonctions dans l'organisme et elles ont particulièrement été étudiées dans le SNC où elles ont des rôles très variés au cours du développement, mais aussi chez l'adulte et dans le vieillissement physiologique ou pathologique. Ces processus physiologiques dans le SNC sont régulés par les multiples ligands des voies purinergiques et

l'activation des récepteurs correspondants, et aussi l'activité d'enzymes et transporteurs à l'origine de la production ou le recyclage des purines.

## **2.1. Signalisation purinergique au niveau cellulaire et moléculaire**

### **2.1.1. Sources d'ATP et d'adénosine : métabolisme et transport des purines**

La disponibilité des purines dans le milieu extracellulaire est déterminée par l'équilibre entre la production et libération de ces purines, et leur élimination par hydrolyse enzymatique et recapture.

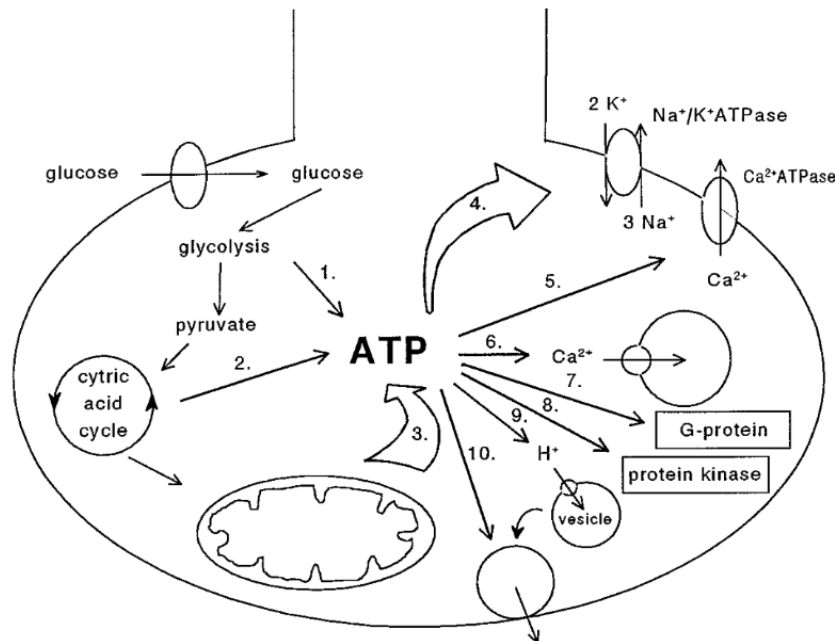
#### **Quelles sont les sources d'ATP dans le SNC ?**

L'**ATP** dans le milieu extracellulaire peut être libéré par les astrocytes ou par les neurones (Boué-Grabot and Pankratov, 2017). Les **astrocytes** ont cependant été identifiés comme source principale d'ATP dans le SNC (Pascual et al., 2005). L'ATP extracellulaire est présent à de faibles concentrations (10nM) car il est rapidement hydrolysé en ADP puis en AMP via les **ecto-ATPases CD39** (*ENTDP1*) ou utilisé par les cellules du SNC (Sperlágh and Vizi, 1996). D'autres protéines comme les NCAM (neural cell adhesion molecules) ont une activité d'ecto-ATPase (Dzhandzhugazyan and Bock, 1993). L'ATP est essentiel pour de nombreux processus cellulaires. La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, qui maintient le potentiel de membrane au repos, consomme environ 60% de l'ATP.

L'ATP peut être stocké dans des vésicules synaptiques. Il peut être **(i) libéré par exocytose par des cellules gliales**, via un mécanisme VNUT (vesicular nucleotide transporter)-dépendant par les microglies, ou calcium-dépendant par les astrocytes, en tant que gliotransmetteur (Coco et al., 2003; Zhang et al., 2007; Dou et al., 2012; Imura et al., 2013; Xiong et al., 2018) **ou par les neurones** en tant que co-neurotransmetteur, agissant sur ses récepteurs purinergiques cibles (Zimmermann, 1994; Sperlágh and Vizi, 1996; Sawada et al., 2008; Lovatt et al., 2012) ; **(ii) possiblement relargué via exocytose lysosomale au niveau des neurones** (entrée d'ATP par VNUT puis transport d'ATP dans les vésicules lysosomales vers les neurites) (Jung et al., 2013) ou **(iii) via des hémicanaux astrocytaires** : les hémicanaux hippocampiques connexines 43 (Cx43) modulent la transmission synaptique basale en libérant de l'ATP. Les jonctions GAP composées des Cx43 sont donc une voie de libération physiologique d'ATP par les astrocytes. D'autres hémicanaux, les pannexine-1 (Panx1) médie la libération d'ATP (Chever et al., 2014), mais aussi les récepteurs P2X7 (Leybaert and Sanderson, 2012; Lopatáň et al., 2015; Boué-Grabot and Pankratov, 2017).

L'ATP intracellulaire est recapturé et stocké dans des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons axonales ou dans les astrocytes (Abbracchio et al., 2009), où sa libération est calcium-dépendante, suite à une stimulation neuronale. La concentration intracellulaire d'ATP

(de l'ordre de 3-10mM) est 50 fois plus importante que celle de l'adénosine monophosphate (AMP), une faible variation d'ATP peut donc induire une forte augmentation des taux d'AMP intracellulaires. La formation d'adénosine à partir du pool cytoplasmique d'ATP est donc un signal important de stress ou augmentation du métabolisme cellulaire (Cunha, 2001b).



Formation et utilisation de l'ATP dans le compartiment intracellulaire présynaptique. La libération d'ATP dans l'espace extracellulaire médie de nombreuses signalisations activité-dépendantes. (Sperlágh and Vizi, 1996)

### Quelles sont les sources d'adénosine dans le SNC ?

**L'adénosine** est un nucléoside purinergique, composé d'une base purique, l'adénine, et d'un ribose, et cette purine est produite par les neurones et les cellules gliales. Elle est **principalement issue de l'hydrolyse de l'ATP dans le milieu extracellulaire** par des ectonucléotidases et sa concentration extracellulaire dépend également de transporteurs équilibratifs permettant la libération d'**adénosine produite dans le milieu intracellulaire** (Cellai et al., 2018). L'adénosine extracellulaire est centrale dans la régulation de nombreuses fonctions cérébrales, que nous décrivons plus loin. L'augmentation locale de la concentration extracellulaire en adénosine reflète la rupture des stocks d'ATP intracellulaires, liée à l'état énergétique des neurones et une forte demande métabolique. L'adénosine régule donc l'homéostasie neuronale en faisant le lien entre le métabolisme énergétique des neurones et avec leur excitabilité.

La **5'-ectonucléotidase CD73** (gène *NT5E*) est la seule enzyme capable de déphosphoryler l'AMP extracellulaire en adénosine dans le cerveau mammifère. Elle est exprimée dans tous les tissus (Zimmermann et al., 2012) et est inhibée par l'AMPCP (5'-[ $\alpha$ , $\beta$ -

méthylène]diphosphate), qui diminue en partie les taux d'adénosine libérée dans des tranches de cortex et des **synptosomes**. En fait, une partie de l'adénosine extracellulaire est issue de **l'hydrolyse de l'ATP/ADP** via CD39 puis de **l'AMP** par CD73, et l'autre est libérée *per se* (Klyuch et al., 2012). Dans l'hippocampe, l'adénosine est libérée par les neurones **présynaptiques** (MacDonald and White, 1985; Smith, 1991; Smith and Lu, 1991; Dale, 2021) et l'activation des NMDARs par le glutamate peut générer une inhibition de la transmission glutamatergique par la libération d'adénosine issue des interneurons (Manzoni et al., 1994).

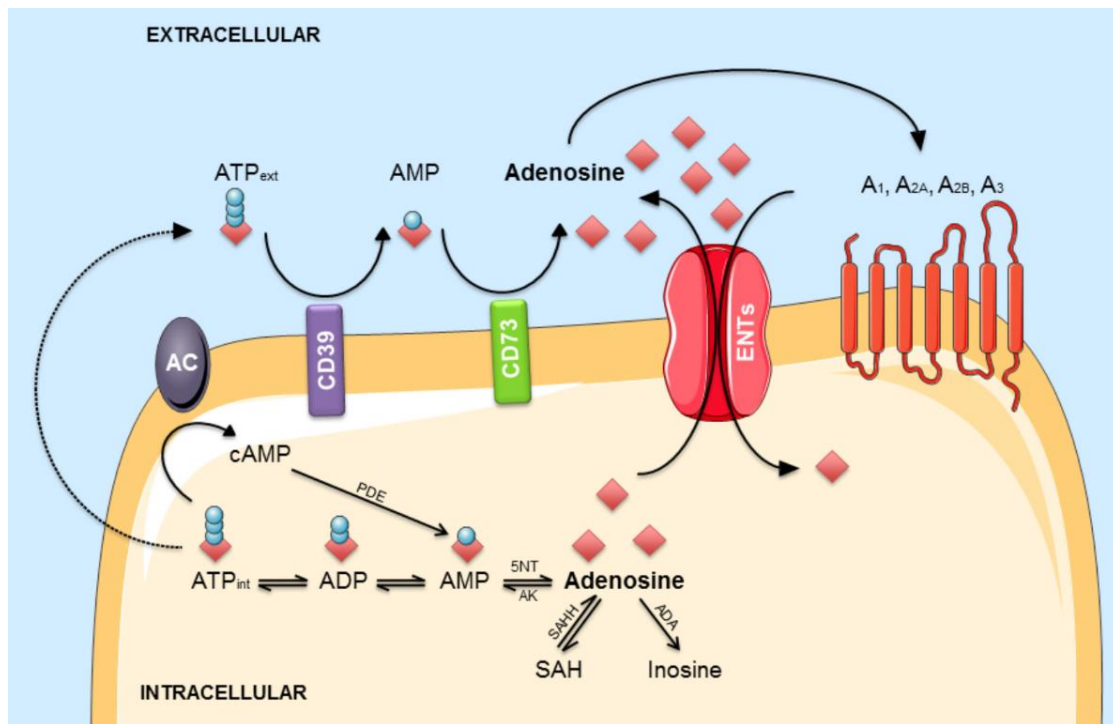
L'**AMPCP** réduit aussi la libération spontanée d'adénosine, qui est de son côté facilitée par la présence d'ouabaine ou de glutamate (Barberis et al., 1984). Les 5'-ectonucléotidases (comme CD73) sont inhibées par la présence d'ATP et d'ADP, ce qui fait que l'activité de CD73 est plus lente que les ecto-ATPases ou ecto-ADPases (CD39). Ce phénomène **d'inhibition transitoire des CD73 explique le retard de l'apparition de l'adénosine extracellulaire suite à une libération d'ATP** (Zimmermann, 1994; Cunha, 2001c). Une fois dans l'espace extracellulaire, des conversions enzymatiques ont lieu via les activités couplées des ectonucléotidases CD39/CD73 qui convertissent séquentiellement ATP/ADP en AMP et l'AMP en adénosine. **La déphosphorylation de l'ATP par l'ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase CD39, puis par la 5'-ectonucléotidase CD73 est le mécanisme principal de production d'adénosine extracellulaire** (Zimmermann et al., 1998, 2012; Zimmermann, 2000). L'AMPc intracellulaire ou libéré dans l'espace extracellulaire peut aussi être converti en 5'-AMP, par une ecto-phosphodiesterase, puis en adénosine via CD73. Cette source d'adénosine peut participer aux changements lents de la concentration extracellulaire d'adénosine.

Dans le milieu extracellulaire, l'adénosine a un temps de demi-vie de 10 secondes et sa concentration est limitée par plusieurs mécanismes. L'adénosine peut être **métabolisée en inosine** via des **adénosine déaminases (ADA)** extracellulaires et peut aussi entrer dans les cellules via **des transporteurs équilibratifs bidirectionnels** aux nucléosides, ENT1 et ENT2. L'adénosine peut aussi être **phosphorylée en AMP par l'adénosine kinase (ADK)**. Ce mécanisme est privilégié dans des conditions où les concentrations d'adénosine sont faibles. **L'ADK** agit en amont pour réguler le niveau basal d'adénosine extracellulaire et l'excitabilité neuronale (Diogenes et al., 2014). L'ADK astrocytaire régule fortement les niveaux d'adénosine extracellulaire (Boison et al., 2010). Cette enzyme régule l'inhibition de la transmission et de la plasticité synaptique dépendantes des récepteurs à l'adénosine A<sub>1</sub>Rs, mais aussi la stimulation de la production de BDNF médiée par le A<sub>2A</sub>R. **L'ADA** est une protéine de 36 kDa, souvent présente sous forme de dimère, exprimée dans le cerveau, elle est principalement cytosolique mais est aussi fortement exprimée à la membrane des neurones où elle interagit avec les récepteurs à l'adénosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub>. La distribution

de l'expression d'ADA dans les tissus corrèle avec des sites de recapture de l'adénosine ce qui est consistant avec la nécessité de l'absorption de l'adénosine avant sa déamination (Nagy et al., 1985; Borea et al., 2016).

Les **transporteurs bidirectionnels équilibratifs** font entrer ou sortir l'adénosine de la cellule, ils transportent les nucléosides (purines et pyrimidines) dans les compartiments intra- ou extracellulaires en fonction de leurs gradients et indépendamment des gradients sodiques. Des transporteurs concentratifs de nucléosides existent aussi, ils fonctionnent par un flux unidirectionnel de l'espace extracellulaire vers le cytosol et nécessite un ou deux ions sodium pour fonctionner contre les gradients de concentration des purines. Ces transporteurs CNT 2 ou 3, même s'ils sont enrichis dans le cerveau et dans les cellules immunitaires, sont minoritaires dans le SNC par rapport aux transporteurs équilibratifs **ENT1 et 2** principalement. La perméabilité des ENTs aux nucléosides est possible via la reconnaissance de leur pentose. Les ENTs ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire des nucléosides et ils contribuent plus spécifiquement à la régulation de multiples fonctions métaboliques et cascades de signalisation médiées par les concentrations intra et extra-cellulaires en adénosine. Ces mécanismes contribuent au maintien d'un tonus adénoenergique extracellulaire (Young et al., 2008; Boswell-Casteel and Hays, 2017). 40% de l'adénosine libérée en réponse à l'activité provient de son transport par les ENTs (Wall and Dale, 2013).

Au niveau **intracellulaire**, les concentrations d'adénosine sont de l'ordre de 50-250nM dans le SNC. Dans ce compartiment, l'adénosine est produite à partir de l'**hydrolyse de l'AMP** par la 5'-ectonucléotidase CD73 ou de l'**hydrolyse de la S-adénosyl-homocystéine (SAH)** par la SAH hydroxylase. La production intracellulaire d'adénosine à partir de SAH est faible, mais nécessaire pour des processus épigénétiques régulés par l'adénosine à partir du précurseur de SAH, la S-adénosylméthionine, qui est le principal **donneur de méthyl**. Il est donc impliqué dans la méthylation de l'ADN, qui favorise la répression de certains gènes. Au cours de phases métaboliques intenses, c'est la production d'adénosine par des 5'-nucléotidases spécifiques de l'AMP qui prévaut (Fredholm et al., 2005; Latini and Pedata, 2008).



Régulation de la production de l'adénosine et de ses concentrations intra- et extracellulaires par différentes enzymes et transporteurs spécifiques (Cellai et al., 2018)

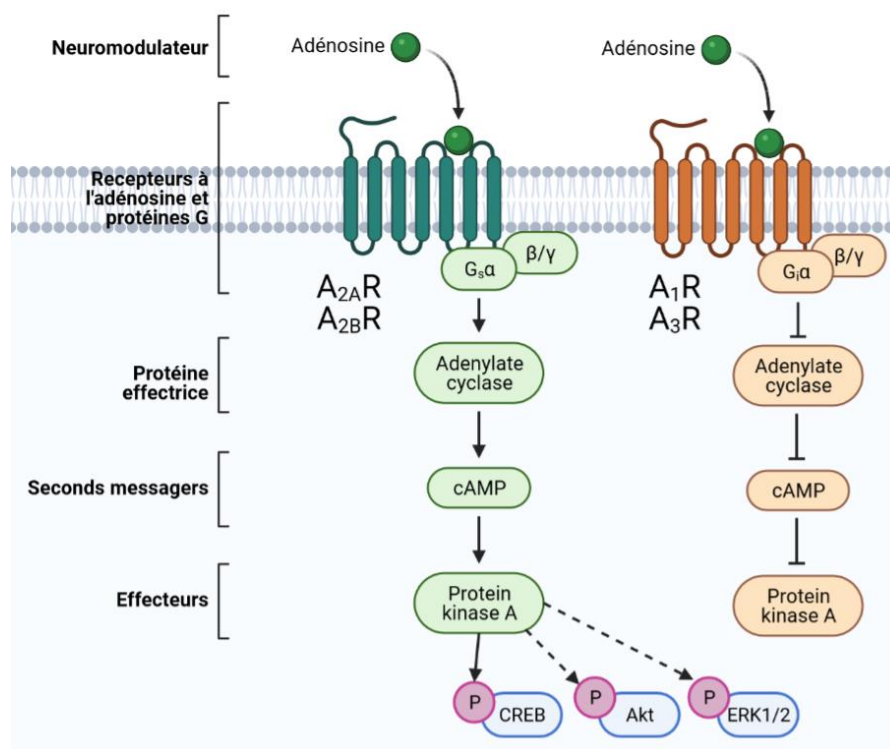
### 2.1.2. Récepteurs à l'ATP et à l'adénosine

Initialement, **deux groupes de récepteurs purinergiques** ont été décrits en 1976 par Geoffrey Burnstock : les **récepteurs P1**, liant l'adénosine, sont sélectivement bloqués par les méthylxanthines, et les **récepteurs P2**, des récepteurs à l'ATP et l'ADP, ne sont pas antagonisés par les méthylxanthines (Fredholm et al., 1994).

Au sein des P2R, on trouve des récepteurs ionotropiques, de type P2X, qui sont des trimères perméables au sodium et calcium et dont il existe 7 sous-types, et des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (RCPG), la famille des P2Y composée de 8 sous-types (Burnstock, 2007). La famille de **récepteurs P2X et P2Y** est exprimée dans le cerveau où elle est impliquée dans une vaste gamme de fonctions, allant de la transmission synaptique à la plasticité à long terme, mais aussi des modifications trophiques et des interactions neurogliales permettant un contrôle du développement du tissu et de la neuroimmunomodulation. Les récepteurs P2 sont donc plus sensibles à l'ATP et à l'ADP qu'à l'adénosine. Ils sont activés par des concentrations d'ATP de l'ordre de 1-100µM (Zimmermann, 1994; Sperlággh et al., 2007).

Les **récepteurs à l'adénosine** sont des RCPGs, ils modulent l'activité des adénylates cyclases (ACs), modifiant les niveaux d'AMPc (Calker et al., 1979). **Quatre sous-types** de

récepteurs à l'adénosine ont été décrits, certains pour lesquels la fixation de l'adénosine inhibe la production d'AMPc, et d'autres qui favorisent son accumulation intracellulaire (Fredholm et al., 1994). Ces récepteurs, A1, A2A, A2B et A3, partagent une forte homologie de structure et forment tous 7 boucles transmembranaires (caractéristiques des RCPGs), avec une partie N-terminale extracellulaire et une partie C-terminale intracellulaire (Maenhaut et al., 1990; Jacobson and Gao, 2006). De manière générale, les récepteurs A1 (A<sub>1</sub>R) et A3 (A<sub>3</sub>R) activent respectivement des protéines Gi/o et Gi/q qui inhibent les adénylates cyclases, tandis que les récepteurs A2A (A<sub>2A</sub>R) et A2B (A<sub>2B</sub>R) activent les adénylates cyclases par des protéines Gs/Golf et Gs/Gq respectivement (Calker et al., 1979; Fredholm et al., 2005; Jacobson and Gao, 2006). La production d'AMPc résultante favorise la neurotransmission glutamatergique en activant des voies de signalisation intracellulaires. Les sous-types de récepteurs A1 et A2A sont les plus abondants dans le cerveau de Mammifères (Dunwiddie and Masino, 2001).

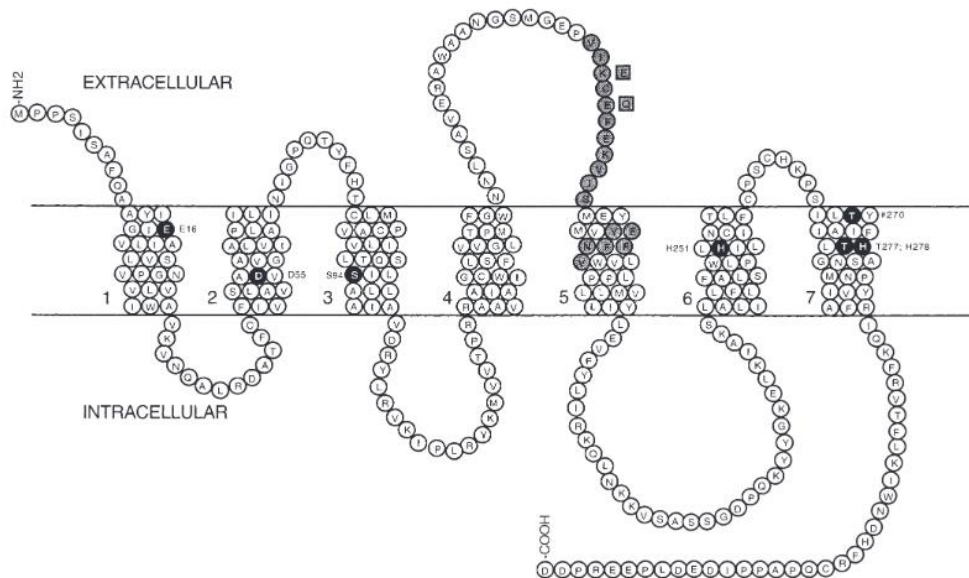


### Voies de signalisation canoniques des récepteurs à l'adénosine couplés aux protéines G activatrices ou inhibitrices des ACs

Les **A<sub>1</sub>Rs** sont exprimés de manière ubiquitaire dans le SNC, dans les neurones principalement mais aussi dans les astrocytes, les microglies et les oligodendrocytes (Fastbom et al., 1987; Fredholm et al., 2005). C'est le sous-type **le plus abondant des récepteurs à l'adénosine** dans une majorité de tissus du cerveau, en particulier l'hippocampe. Les récepteurs A1 ont une **forte affinité pour l'adénosine** (1-30nM) et participent à la régulation de la neurotransmission excitatrice aux niveaux pré- et postsynaptiques. L'activation des A<sub>1</sub>Rs inhibe l'activité des ACs et favorise l'activité de la phospholipase C (PLC) ce qui inhibe l'activité



neuronale *in fine*. Ils régulent des canaux K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> (Jacobson and Gao, 2006). Dans des conditions basales, les niveaux relativement faibles d'adénosine extracellulaire activent préférentiellement les A<sub>1</sub>Rs, qui ont une plus forte affinité pour l'adénosine par rapport aux A<sub>2A</sub>Rs. (Ribeiro et al., 2002)



Structure moléculaire du récepteur A1 (Olah and Stiles, 2000a)

Le **récepteur A2A** est particulièrement intéressant par son rôle dans la plasticité synaptique aux synapses glutamatergiques, mais aussi par sa régulation des fonctions gliales et métaboliques dans le cerveau (Cunha et al., 2008). Le A<sub>2A</sub>R est codé par le gène *Adora2a*, et cette protéine est composée de 410 acides aminés chez l'homme et 409 chez la souris. Son **affinité pour l'adénosine est élevée**, de l'ordre de 30nM. Le A<sub>2A</sub>R est couplé à des protéines Gs/olf et lorsqu'il est activé, par des ligands au niveau de la boucle transmembranaire 7, il induit la stimulation des ACs et de la voie AMPc/PKA, permettant la phosphorylation de multiples substrats de la PKA, comme DARPP-32, CREB ou les AMPARs. Cela induit l'augmentation de l'expression de différents gènes. L'activation sélective d'une protéine Gs est possible par son couplage avec les A<sub>2A</sub>Rs au niveau de la troisième boucle intracellulaire du RCPG (Olah, 1997; Doré et al., 2011). **L'activation des A<sub>2A</sub>R amplifie donc l'activité des ACs** (Jacobson and Gao, 2006) et le CGS-21680 est un agoniste spécifique du A<sub>2A</sub>R dans l'hippocampe (Cunha et al., 1996). L'activation des A<sub>2A</sub>Rs présynaptiques favorise le relargage de neurotransmetteur.

Les récepteurs A2A sont exprimés dans des zones restreintes chez l'adulte : principalement dans **le striatum, au niveau des neurones épineux moyens striatopallidaux, et aussi dans le bulbe olfactif**, mais leur expression est aussi détectée (20 fois moins que dans le striatum) **dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex** (Cunha et al., 1996; Rosin et al., 1998; Lopes et al., 2004).

Les RCPGs ne sont pas des unités fonctionnelles simples, mais ils composent plutôt des **assemblages supramoléculaires**, constitués d'homomères ou d'hétéromères de RCPGs (Ciruela et al., 2006; Ferré and Ciruela, 2019). Les  $A_{2A}R$ s sont en effet présents sous forme d'**homodimères**, qui est leur forme active et constitue 90% des récepteurs  $A_{2A}R$  à la surface. Cette interaction ne se fait pas via la partie C-ter du RCPG (Canals et al., 2003a). **Les  $A_{2A}R$ s peuvent aussi s'hétérodimériser avec d'autres RCPGs comme les récepteurs  $A_1$ ,  $A_2B$ , mais aussi les récepteurs à la dopamine  $D_2$  ( $D_2R$ ), aux endocannabinoïdes  $CB_1$ , le récepteur à tyrosine kinase B (TrkB) et le récepteur métabotropique au glutamate mGluR5, ainsi que des enzymes comme ADA ou CD73.** Ce type d'association protéique génère de nouvelles caractéristiques biochimiques en modulant les propriétés de liaison, couplage aux protéines G ou dynamique du récepteur (Ferré et al., 2007; Borroto-Escuela et al., 2018).

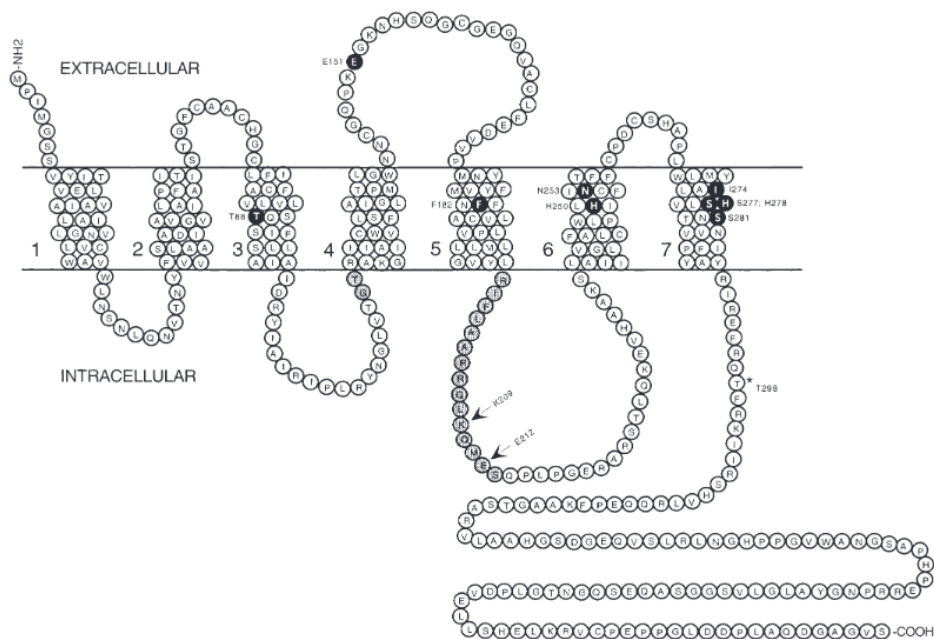
- En présence d'hétérodimères  **$A_1R$ - $A_{2A}R$** , l'activation des  $A_{2A}R$  réduit l'affinité des  $A_1R$  pour leurs agonistes (Ciruela et al., 2006; Borroto-Escuela et al., 2018)
- Les **récepteurs  $A_2A$  et  $A_2B$**  sont couplés à des protéines Gs/Golf. L'expression du  $A_{2A}R$  dans des modèles de cellules hétérologues favorise l'expression du  $A_{2B}R$  à la surface. Les  $A_{2A}R$  et les  $A_{2B}R$  s'hétérodimérisent et dans ces conditions il semble que la capacité du  $A_{2A}R$  à lier ses agonistes est réduite. Cependant dans le SNC l'expression du  $A_{2B}R$  est très faible, mais ils pourraient jouer un rôle en hétérodimère avec  $A_{2A}R$  dans des contextes de neuroinflammation (Moriyama and Sitkovsky, 2010; Popoli and Pepponi, 2012; Hinz et al., 2018).
- L'activation des mGluR5 potentialise la neurotransmission médiée par les NMDARs via la phosphorylation des sous-unités NR2B des NMDARs. Cet effet est bloqué en l'absence du  $A_{2A}R$  (modèle KO). Les  **$A_{2A}R$  et mGluR5** sont colocalisés aux synapses dans l'hippocampe, et ils agissent en **synergie**. Les  $A_{2A}R$ s interagissent avec les mGluR5 et auraient donc un **rôle permissif pour la potentiation des NMDARs** médiée par le récepteur mGluR5. Cet effet est très intéressant car il est impliqué dans les processus de LTP ou LTD dans l'hippocampe. (Tebano et al., 2005; Sarantis et al., 2015; Krania et al., 2018; Temido-Ferreira et al., 2020).
- L'interaction fonctionnelle entre le  **$A_{2A}R$  et le  $D_2R$**  a été montrée dans le striatum, où **l'activation du  $A_{2A}R$  réduit l'affinité des  $D_2R$ s pour leurs agonistes**. La stimulation des  $D_2R$ s inhibe l'accumulation d'AMPC induite par l'activation des  $A_{2A}R$  (couplés à une protéine Gs/olf) et les  $D_2R$ s sont aussi capables de désensibiliser les  $A_{2A}R$ s. Ces interactions modulent l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteurs via la voie Gq/11-PLC, mais aussi la phosphorylation de protéines et la régulation de

l'expression de gènes par une signalisation médiée par les ACs (Canals et al., 2003b; Ferré et al., 2008, 2010).

- Les **CB1Rs** sont des RCPGs présents dans le striatum ont un rôle dépresseur dans les processus de mouvements. Les  $A_{2A}$ Rs forment des hétérocomplexes avec les CB1R et **l'activation des  $A_{2A}$ Rs bloque les effets médiés par les CB1Rs**. Les CB1Rs sont aussi exprimés dans l'hippocampe où ils peuvent réduire la libération des neurotransmetteurs aux synapses glutamatergiques ou GABAergiques. Ils sont alors activés par des endocannabinoïdes libérés en postsynaptique (Wang, 2003; Carriba et al., 2007; Kano et al., 2009; Schmitz et al., 2016). Le blocage des CB1Rs inhibe d'ailleurs la potentialisation de la transmission excitatrice induite par la co-activation des mGluR5 et des NMDARs (Kouvaros and Papatheodoropoulos, 2016).
- L'interaction entre les récepteurs  $A_{2A}$  et **TrkB** (Tropomyosin related kinase B) a été montrée dans l'hippocampe. La formation d'hétérocomplexes  $A_{2A}$ R-TrkB pourrait favoriser la plasticité synaptique facilitée par la signalisation liant  $A_{2A}$ R et le BDNF, bien décrite dans l'hippocampe (Di Palma et al., 2020).
- **GPR37** est un RCPG orphelin exprimé dans le SNC, associé à la maladie de Parkinson, mais dont la fonction n'est pas encore clairement décrite. Il est exprimé dans l'hippocampe, au niveau des axones et dendrites et son interaction fonctionnelle avec les  $A_{2A}$ Rs consisterait en un **changement de la sensibilité des  $A_{2A}$ Rs à leurs ligands**. Dans le striatum, l'interaction directe entre  $A_{2A}$ R et GPR37 a été montrée et l'absence de GPR37 favorise l'expression des  $A_{2A}$ Rs ainsi que les effets de leur agoniste CGS21680, i.e. l'accumulation d'AMPc aux terminaisons présynaptiques. Le GPR37 pourrait aussi intervenir dans l'interaction  $A_{2A}$ R-D2R (Lopes et al., 2015; Morató et al., 2017).
- L'interaction  **$A_{2A}$ R-ADA** modifie la structure et la fonction des  $A_{2A}$ R car l'ADA agit comme un ligand allostérique des  $A_{2A}$ Rs. Le catabolisme de l'adénosine est un processus important pour réguler la biodisponibilité de l'adénosine extracellulaire au niveau de ces récepteurs. L'ADA diminue les quantités d'adénosine, et son interaction avec  $A_{2A}$ R favorise la signalisation MAPK liée à l'activation du  $A_{2A}$ R (Gracia et al., 2011)
- Dans les ganglions de la base, CD73 et  $A_{2A}$ R colocalisent, notamment aux sites postsynaptiques. CD73 a un rôle crucial dans l'activation des  $A_{2A}$ Rs. Cette enzyme catalyse la production d'adénosine à partir d'AMP et en l'absence de CD73, **les niveaux d'adénosine sont plus faibles au niveau des complexes CD73- $A_{2A}$ R**, ce

qui modifie l'activité des A<sub>2A</sub>Rs. Il semblerait que l'expression des A<sub>2A</sub>Rs module l'expression des CD73 (Augusto et al., 2013, 2021; Young et al., 2016).

Les A<sub>2A</sub>Rs sont définis comme des RCPGs de par leur interaction avec des protéines G hétéromériques et **l'arrangement heptahelical de leurs segments transmembranaires**. Ils peuvent recruter des kinases couplées à des protéines G (GRKs) ainsi que des arrestines qui peuvent désensibiliser et favoriser l'internalisation des RCPGs, et sont aussi à l'origine de nouvelles voies de signalisation indépendantes des protéines G. La **désensibilisation** d'un récepteur est définie comme le phénomène par lequel une exposition préexistante ou continue à un agoniste réduit de la réponse fonctionnelle du récepteur à un traitement avec l'agoniste. Le A<sub>2A</sub>R est rarement internalisé, il est désensibilisé mais le nombre de récepteurs à la membrane ne change pas (Zezula and Freissmuth, 2008).



Structure moléculaire du A<sub>2A</sub>R. Sa partie C-terminale est longue et interagit avec de multiples protéines (Olah and Stiles, 2000a)

Le long domaine C-ter intracellulaire des A<sub>2A</sub>Rs, composé de **122 acides aminés** chez l'humain, interagit aussi avec de nombreuses protéines indépendantes de son activité canonique (Olah and Stiles, 2000b; Keuerleber et al., 2011). Il interagit de manière transitoire avec les protéines mentionnée ci-après, USP4, ARNO, TRAX, calmoduline, NECAB2,  $\alpha$ -actinine et SAP102 :

L'enzyme de déubiquitination **USP4** (Ubiquitin-Specific Protease 4), qui catalyse la réaction de retrait de l'ubiquitine, interagit avec le A<sub>2A</sub>R et favorise son expression membranaire (Milojević et al., 2006).

Une voie de signalisation médiée par A<sub>2A</sub>R, indépendamment des protéines G, est la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase). **ARNO** (Arf nucleotide site opener) interagit avec la portion proximale de C-ter du A<sub>2A</sub>R et favorise la stimulation de cette voie MAPK. En effet, les microdomaines membranaires riches en cholestérol sont essentiels pour l'activation des AC via les Gs et dans des compartiments sans cholestérol, l'activation d'ARNO stimule la voie MAPK médiée par les A<sub>2A</sub>Rs, indépendamment des protéines Gs (Gsandtner et al., 2005; Charalambous et al., 2008).

**TRAX** (translin-X-associated protein) interagit avec le A<sub>2A</sub>R et médie sa fonction dans la neuritogenèse des cellules PC-12, via la production de NGF. D'autre part, TRAX forme un complexe avec DISC-1 et la kinase GSK3β dans le noyau. L'activation du A<sub>2A</sub>R inhibe GSK3 et permet de libérer TRAX du complexe protéique et d'engager des processus de réparation de l'ADN. Le lien entre TRAX et le A<sub>2A</sub>R reste à être exploré (Sun et al., 2006; Chien et al., 2018).

La **calmoduline** peut interagir avec le A<sub>2A</sub>R et inhiber l'activation de la protéine Gs par le A<sub>2A</sub>R. La calmoduline se lie aux A<sub>2A</sub>Rs présents dans les hétérodimères D2-A<sub>2A</sub>R, induit une modification des concentrations en calcium et modifie donc la fonction des dimères (Woods et al., 2008; Piirainen et al., 2015). Une autre protéine de la famille des calmodulines, NCS-1 (neuronal calcium sensor protein 1), se lie à l'A<sub>2A</sub>R (Navarro et al., 2012).

**NECAB2** (neuronal calcium binding protein 2) est la troisième protéine fixant le calcium qui interagit avec le A<sub>2A</sub>R. Elle régule l'expression membranaire du A<sub>2A</sub>R et module l'efficacité du couplage du A<sub>2A</sub>R avec les voies de signalisation en aval en stimulant la fonction du A<sub>2A</sub>R (Canela et al., 2007).

L'**α-actinine** se lie à la F-actine et est donc impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Le A<sub>2A</sub>R interagit avec l'α-actinine-1 et cette interaction module la dynamique du A<sub>2A</sub>R ainsi que son internalisation via un mécanisme impliquant la β-arrestine (Burgueño et al., 2003). L'α-actinine-1 est fortement exprimée au niveau de la PSD des synapses excitatrices, et interagit avec mGluR5, NMDAR, ainsi que les récepteur purinergiques P2X7 (Cabello et al., 2007).

**SAP102** (synapse associated protein 102) est une protéine de la famille des MAGUK (membrane-associated guanylate kinase-like domain), qui organise la synapse en ancrant des protéines transmembranaires et cytoplasmiques, et contrôle le mouvement des NMDARs en

se liant à leurs sous-unités NR2. Au cours des deux premières semaines du développement, SAP102 est fortement exprimée au niveau du soma et de la PSD des synapses excitatrices, puis son expression diminue. L'interaction du récepteur A<sub>2A</sub> et de SAP102 au niveau postsynaptique dans le striatum réduit la mobilité du A<sub>2A</sub>R (Müller et al., 1996; Zheng et al., 2010).

La partie C-ter du A<sub>2A</sub>R intègre donc différents signaux, interagit avec certaines protéines en fonction de ceux-ci et pourrait donc agir comme un détecteur de coïncidence.

**Les récepteurs A<sub>2B</sub>** activent aussi les ACs via des protéines Gs et la PLC. Ils sont exprimés à de faibles taux dans le SNC, mais sont toutefois présents, dans les cellules neuronales, gliales et dans les vaisseaux sanguins, ainsi que dans les tissus périphériques. Le A<sub>2B</sub>R répond à des concentrations d'adénosine importantes (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ), même s'il peut activer la voie MAPK en présence d'adénosine à des concentrations physiologiques. Les A<sub>2B</sub>Rs seraient plutôt impliqués dans les processus de neuroinflammation où les concentrations en adénosine extracellulaire sont importantes. Les A<sub>2B</sub>Rs ont aussi un rôle particulier dans les astrocytes où ils potentialisent les réponses calciques induites par l'adénosine (Jacobson and Gao, 2006; Popoli and Peponi, 2012). La nétrine-1 se lie au A<sub>2B</sub>R dans le SNC ce qui induit une augmentation de l'AMPc et favorise la croissance axonale médiée par la nétrine-1 au cours du développement. Les A<sub>2B</sub>Rs seraient donc aussi impliqués dans ces phases précoces de développement des circuits neuronaux (Corset et al., 2000).

**Les récepteurs A<sub>3</sub>** sont exprimés au niveau des neurones corticaux et hippocampiques (Lopes et al., 2003), ainsi que dans les cellules gliales et endothéliales. Ils sont fortement exprimés dans les cellules inflammatoires ou cancéreuses dans lesquelles ils contrôlent le cycle cellulaire (Zhou et al., 1992; Abbrachi et al., 1995; Jacobson and Gao, 2006; Borea et al., 2015). Ces récepteurs ont une faible affinité pour l'adénosine (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ), inhibent les ACs, et participent à la mobilisation des stocks de calcium intracellulaire par leur couplage à la PLC. Ils modulent l'activité des autres récepteurs à l'adénosine, en supprimant par exemple l'inhibition des réponses aux cytokines proinflammatoires par les microglies médiée par les A<sub>2A</sub>Rs. Les A<sub>3</sub>Rs sont en particulier exprimées par les microglies (Calovi et al., 2019) et leur activation induit la phosphorylation des ERK1/2 et donc l'activation de la voie MAPK (Borea et al., 2015), mais aussi la modulation de la croissance des prolongements microgliaux par leur action synergétique avec les récepteurs P2Y<sub>12</sub> (Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2012). Leur activation supprime aussi la production de TNF- $\alpha$  et d'interleukine-12 suite à une

exposition des microglies au LPS, en inhibant les voies PI3K/Akt et NF- $\kappa$ B (Lee et al., 2006; Agostinho et al., 2020).

### 2.1.3. Les voies de signalisation associées aux A<sub>2A</sub>R

**Le récepteur A<sub>2A</sub> est associé à plusieurs voies de signalisation, principalement les voies AC/AMPC et MAPK.** D'autres voies de signalisation sont mentionnées dans le tableau ci-après.

La cascade de signalisation en aval de l'activation des récepteurs à l'adénosine implique principalement **l'activation des ACs** et la production subséquente d'AMPC (Cooper et al., 1995) via le couplage du A<sub>2A</sub>R avec une protéine Gs/olf. L'effecteur de cette voie est la protéine kinase A (PKA) dépendante des niveaux d'AMPC intracellulaires. La **PKA** peut phosphoryler de multiples protéines et récepteurs, des phosphodiésterases, CREB (cAMP-responsive element binding protein) et DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein) (Calker et al., 1979; Fredholm et al., 2005; Preti et al., 2015). Les réponses à l'AMPC sont différentes en fonction des compartiments cellulaires, et on peut noter que certaines ACs sont enrichies au niveau des radeaux lipidiques, où les A<sub>2A</sub>R sont présents. La suppression du cholestérol altère le couplage du A<sub>2A</sub>R à la protéine Gs et l'activation subséquente de l'AC (Charalambous et al., 2008). Il existe des ACs sensibles à l'activité et d'autres non AC type I (sensibles au Ca<sup>2+</sup> / calmoduline) ou II (Wayman et al., 1996), qui sont essentielles pour la mise en place des processus de plasticité dans le cerveau (Villacres et al., 1995; Wu et al., 1995).

En dehors des radeaux lipidiques, l'activation du A<sub>2A</sub>R active la **voie MAPK**, indépendamment de son activité Gs (Charalambous et al., 2008). L'adénosine via les A<sub>2A</sub>Rs induit la **phosphorylation et activation de ERK1/2** (Schulte and Fredholm, 2003), et cet effet est notamment important pour la prolifération des cellules endothéliales (Seidel et al., 1999). Le A<sub>2A</sub>R interagirait également directement avec **le récepteur à tyrosine kinase FGF2** (Fibroblast growth factor receptor 2), et leur activation simultanée active la voie MAPK/ERK. Cette interaction postsynaptique est impliquée dans des processus de LTP dans des neurones striatopallidaux et dans la formation d'épines dendritiques dans des neurones hippocampiques (Flajolet et al., 2008).

Voie moléculaire couplée au A <sub>2A</sub> R	Référence
<b>PKC (protéine kinase C)</b>	(Cunha and Ribeiro, 2000)
<b>PPAR<math>\gamma</math> (peroxisome proliferator activated-receptor)</b>	(Nayeem et al., 2013; Khayat and Nayeem, 2017)
<b>JNK (c-jun N-terminal kinases)</b>	(Genovese et al., 2009; Melani et al., 2009)
<b>PI-3K (phosphoinositide 3-kinase)</b>	(Ahmad et al., 2013)
<b>Phosphatases</b>	(Murphy et al., 2003)
<b>Kinases Src (sarcoma)</b>	(Che et al., 2007)
<b>Canaux calciques (N- et P-)</b>	(Gubitz et al., 2002)

Tableau récapitulant des voies de signalisation médiées par le A<sub>2A</sub>R

## 2.2. La signalisation adénoenergique dans différents types cellulaires a des rôles variés dans la physiologie du SNC

L'ATP est décrit comme un neurotransmetteur dans le SNC. Comme présenté précédemment, il active les récepteurs P2X ou P2Y et module de nombreuses fonctions : il s'agit d'une molécule de signalisation extracellulaire cruciale pour la communication intercellulaire dans le SNC. Il a été montré que l'ATP libéré en tant que gliotransmetteur régule l'excitabilité des réseaux dans l'hippocampe, et que l'expression et l'activité des récepteurs P2X à l'ATP ont un rôle de neuromodulation dans le SNC (Stevens et al., 2002; Pankratov et al., 2009; Lee et al., 2013; Boué-Grabot and Pankratov, 2017; Bertin et al., 2021).

Néanmoins, **l'hydrolyse de l'ATP en adénosine dans le milieu extracellulaire** est un processus crucial pour la régulation fine de l'activité des réseaux neuronaux (Cunha et al., 1998; Almeida et al., 2003). L'adénosine a un double rôle dans le SNC : il s'agit d'un **senseur métabolique** capable de signaler un déséquilibre énergétique des cellules dans le tissu (Cunha, 2016), et aussi d'un **neuromodulateur régulant la coordination des réseaux neuronaux et des synapses** (Jacobson et al., 2019). Je décrirai ici le rôle de l'adénosine et des A<sub>2A</sub>Rs en tant que régulateurs fins de la plasticité synaptique par des voies de communication neurogliales.

Comme mentionné précédemment, les **récepteurs A<sub>2A</sub>** sont principalement exprimés dans les neurones épineux moyens striatopallidiaux du striatum, mais aussi dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex. Leur expression s'étend à de **nombreux types cellulaires**, les cellules neuronales, gliales, et endothéliales, ce qui sous-tend de multiples fonctions de ce récepteur dans le SNC (Cunha et al., 1996; Fiebich et al., 1996; Sebastiao, 1996; Rosin et al., 1998; Lopes et al., 2004; Matos et al., 2013). De manière intéressante, l'expression du A<sub>2A</sub>R et



d'autres récepteurs purinergiques dans des cellules neuronales et non-neuronales implique la présence de nombreuses voies de communication neurogliales et de signalisations interconnectées et complexes. Je présenterai ces fonctions dans les cellules neuronales, gliales et endothéliales (Pascual et al., 2005; Agostinho et al., 2020; Lopes et al., 2021).

## 2.2.1. Rôle des A<sub>2A</sub>R dans les neurones

### 2.2.1.1. Modulation de l'excitabilité neuronale : rôle de neuromodulateur du A<sub>2A</sub>R en présynaptique

L'adénosine a un rôle de **neuromodulateur** de l'activité synaptique dans le système nerveux central. Plus précisément, elle a un rôle bien décrit dans la partie présynaptique des synapses glutamatergiques, où **les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> ont une action coordonnée pour réguler la libération de neurotransmetteurs** (Sebastiao and Ribeiro, 2009; Lopes et al., 2019). En effet, la saillance de l'information transmise au sein des réseaux neuronaux dépend de cette action (Lopes et al., 2002; Rebola et al., 2005; Sebastião and Ribeiro, 2015). Le ratio des récepteurs A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub> présents aux synapses glutamatergiques module donc l'excitabilité des neurones : **le A<sub>2A</sub>R favorise la libération de neurotransmetteur tandis que le A<sub>1</sub>R l'inhibe.**

Dans un contexte physiologique où le flux d'informations est faible, en intensité ou en fréquence, c'est l'inhibition tonique de la transmission synaptique médiée par le A<sub>1</sub>R qui prédomine. L'activité des A<sub>2A</sub>Rs n'est pas mise en jeu dans cette situation. Lorsqu'un signal important est transmis dans le circuit neuronal, il peut le modifier structurellement. Se mettent alors en place des mécanismes de plasticité à la synapse : localement au niveau d'une synapse, de l'ATP est libéré, puis hydrolysé en adénosine par l'action très efficace des 5'-ectonucléotidases décrites précédemment. Dans ces conditions, **les A<sub>2A</sub>Rs présynaptiques activés vont freiner l'action des A<sub>1</sub>Rs** (Lopes et al., 1999; Ciruela, 2006), **mais aussi des CB1R présynaptiques**, tous deux inhibiteurs de la transmission synaptique. L'hétérodimérisation du A<sub>2A</sub>R avec les CB1R favorise la libération de vésicules synaptiques (Martire et al., 2011). La facilitation induite par l'activation des A<sub>2A</sub>R présynaptiques passe aussi par **l'augmentation de l'entrée de calcium** par des canaux calciques voltage-dépendants (Ghosh and Greenberg, 1995) et augmentant ainsi la libération de glutamate par exocytose de vésicules synaptiques (Cunha, 2016). Au niveau de cette synapse, **une quantité plus importante de glutamate sera donc libérée.** L'efficacité du réseau de neurones est donc modifiée localement par cette augmentation de la libération de neurotransmetteurs mais aussi par la désensibilisation des systèmes inhibiteurs en présynaptique (A<sub>1</sub>Rs et CB1Rs). Les A<sub>2A</sub>Rs ont donc un rôle clé dans la modulation de la plasticité des circuits neuronaux. Ils sont actifs au cours de processus de LTP notamment, et donc essentiels aux fonctions d'apprentissage et de mémoire dans l'hippocampe.

### 2.2.1.2. Modulation de l'excitabilité neuronale : rôle de neuromodulateur du A<sub>2A</sub>R en postsynaptique

En parallèle de son rôle présynaptique, le A<sub>2A</sub>R postsynaptique est engagé dans l'induction et le soutien de modifications de la plasticité synaptique, comme les processus de potentiation à long terme (LTP).

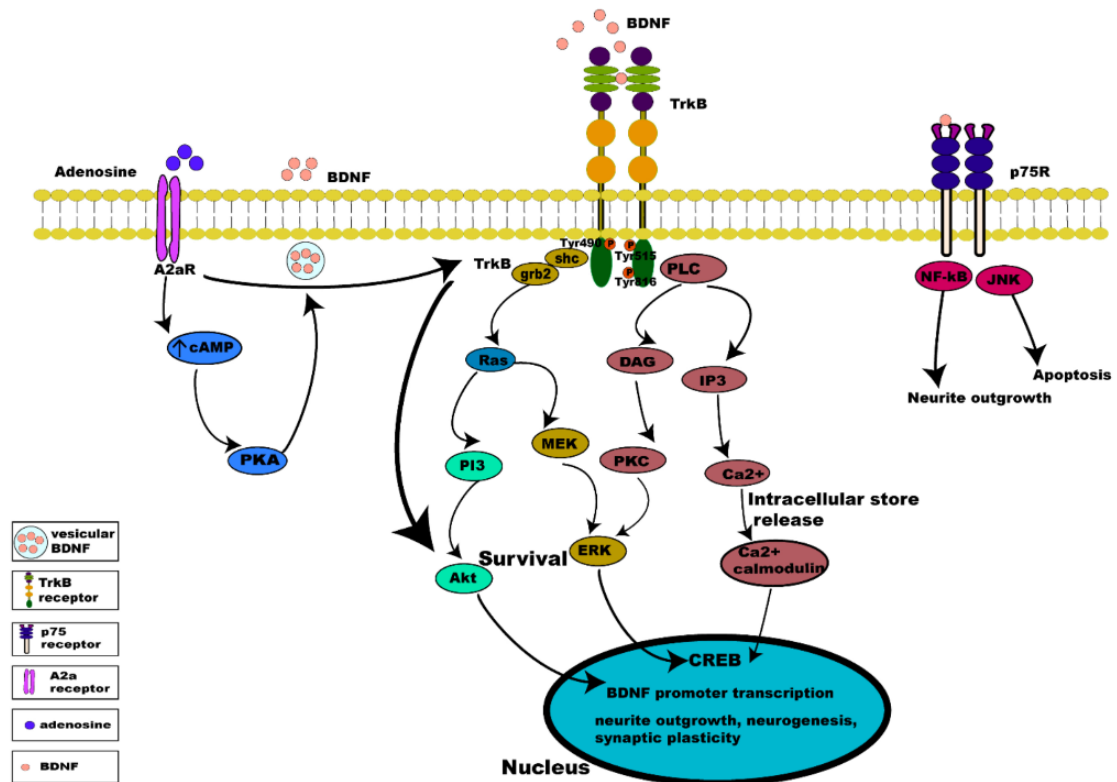
L'activation des A<sub>2A</sub>Rs en présynaptique, dépendante de la concentration locale en adénosine, permet l'**augmentation de la libération de glutamate** dans la fente synaptique. Le glutamate se fixe sur ses récepteurs postsynaptiques, les NMDARs et les AMPARs. L'activation des NMDARs induit des flux de calcium postsynaptiques et module la dynamique des AMPARs et la plasticité médiée par ces récepteurs. En effet, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs induit l'augmentation de l'expression membranaire des sous-unités GluA1 des AMPARs et leur phosphorylation au niveau de la sérine 845 par la PKA, ce qui facilite les courants médiés par les AMPARs et leur translocation vers des pools extrasynaptiques où ils sont disponibles pour être recrutés lors des processus de LTP (Dias et al., 2012, 2013). Le récepteur **A<sub>2A</sub> facilite donc la LTP dans l'hippocampe**. D'autre part, le **A<sub>2A</sub>R interagit avec les mGluR5** pour stimuler les courants calciques associés aux NMDARs et **potentialiser la neurotransmission glutamatergique** (Rebola et al., 2008). Ce phénomène soutient donc l'induction de LTP et renforce son amplitude dans l'hippocampe.

Les A<sub>2A</sub>Rs ont ainsi un double rôle dans la facilitation synaptique, ils réduisent les systèmes d'inhibition en présynaptique et favorise l'activité des NMDARs, et des AMPARs, responsables de la plasticité des réseaux neuronaux en postsynaptique.

### 2.2.1.3. A<sub>2A</sub>R et BDNF

Le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) est un facteur trophique avec de nombreuses fonctions dans le SNC. Il module notamment la prolifération, différenciation et survie neuronale, mais aussi la croissance axonale et la plasticité des synapses. Au niveau **présynaptique**, le BDNF augmente le nombre de vésicules au niveau de la zone active et la libération de glutamate. Au niveau **postsynaptique**, le BDNF médie aussi l'augmentation des niveaux de AMPARs et NMDARs. L'activation du A<sub>2A</sub>R postsynaptique induit la transcription des ARNm codant pour le BDNF et la sécrétion de BDNF dépendantes du calcium, par son activation de la voie AC/AMPC/PKA (Pradhan et al., 2019). Le BDNF, **couplé à son récepteur TrkB**, est requis pour les processus de LTP (Sebastião et al., 2011). Le BDNF et son récepteur TrkB sont exprimés aux synapses glutamatergiques dans l'hippocampe. L'activation des A<sub>2A</sub>Rs régule la production de BDNF et ses effets de potentialisation de la transmission synaptique dans l'hippocampe. (Diogenes, 2004; Tebano et al., 2007). **Les A<sub>2A</sub>Rs peuvent aussi transactiver les TrkB**s directement, en absence de BDNF, via la famille des Src, en

quelques minutes ou heures (Pradhan et al., 2019). L'activation des A<sub>2A</sub>R active les voies PI3K/Akt via les TrkB dans des neurones hippocampiques. Cela induit des effets similaires à ceux du NGF ou BDNF sur les TrkB, mais sur un temps plus long, et confère donc un rôle trophique à l'adénosine via les A<sub>2A</sub>R (Lee and Chao, 2001).



Voies de signalisation médiées par le BDNF et son récepteur TrkB, associé au A<sub>2A</sub>R. Les A<sub>2A</sub>R peuvent transactiver les TrkB et favoriser la survie neuronale. (Pradhan et al., 2019)

Le BDNF joue un rôle dans le remodelage des épines dendritiques (Wilson Horch et al., 1999; Rex et al., 2007; Park and Poo, 2013), **l'activation des A<sub>2A</sub>R favorise l'élongation des dendrites, et la complexification de l'arborisation dendritique dépend du BDNF** (Ribeiro et al., 2016). Dans l'hippocampe, le A<sub>2A</sub>R est donc capable d'engager la **modulation synaptique médiée par la voie BDNF/TrkB**.

Dans le SNC, les astrocytes produisent la majorité de l'ATP extracellulaire, qui module les niveaux d'adénosine et donc l'excitabilité du réseau. Ils font partie de la **synapse tripartite** définie par la zone présynaptique, postsynaptique et les prolongements astrocytaires au contact de la synapse dans le cerveau (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009).

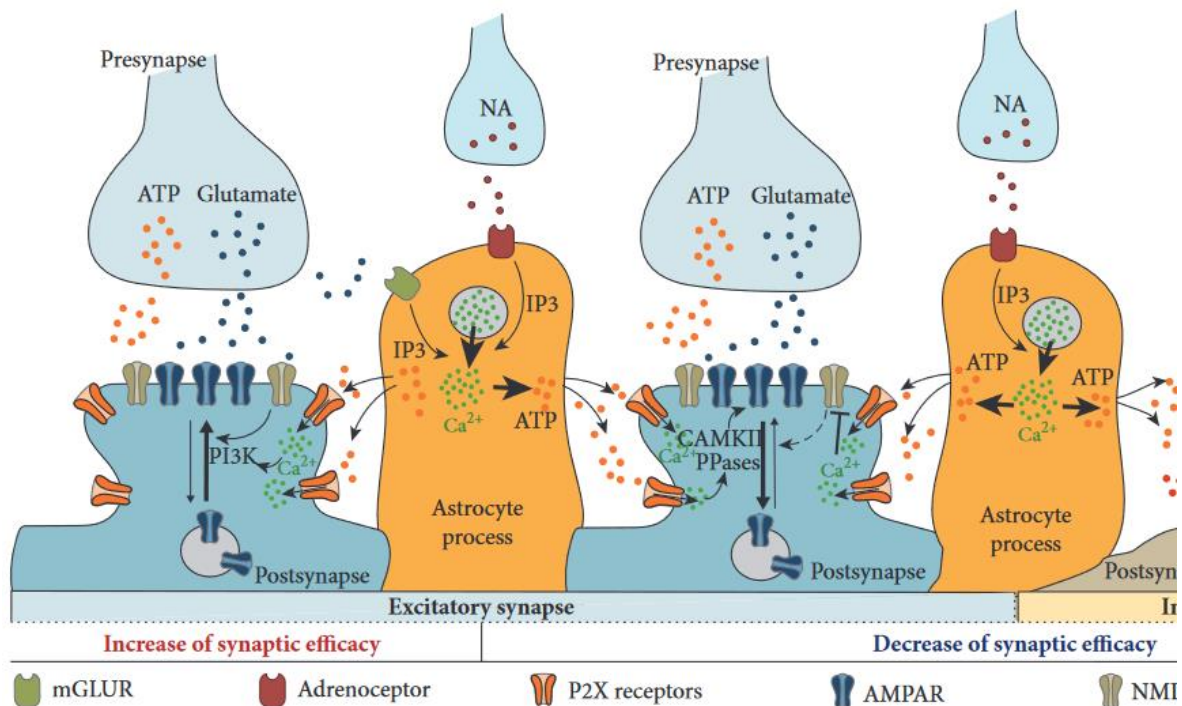
## 2.2.2. Rôle des astrocytes dans la signalisation adénoenergique

### 2.2.2.1. Rôle indirect des astrocytes sur les A<sub>2A</sub>Rs synaptiques

Les astrocytes possèdent aussi des récepteurs à l'ATP et à l'adénosine, notamment les A<sub>2A</sub>Rs (Boison et al., 2010). Les astrocytes peuvent libérer de l'ATP par exocytose via les hémicanaux des jonctions gap, des canaux ioniques et P2X7R, qui est une source importante d'adénosine dans le réseau. En effet, les astrocytes libèrent de l'ATP lors d'une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, et l'ATP ainsi que l'adénosine dérivée de cet ATP activent respectivement les récepteurs P2 et P1 au niveau des neurones, modulant ainsi leur activité. (Coco et al., 2003; Araque et al., 2014; Harada et al., 2016). Les astrocytes fournissent un **soutien métabolique et structurel aux neurones et aux synapses, participent au guidage axonal et à la synaptogenèse ainsi qu'à la transmission et plasticité synaptiques** (voir Partie 1., (Hines and Haydon, 2014; Verkhratsky and Nedergaard, 2014). Ils jouent un rôle central dans la coordination des réseaux neuronaux. En réponse à l'activité synaptique, les astrocytes produisent de grandes quantités de calcium ce qui nourrit la communication et l'activation d'un réseau d'astrocytes (syncytium) (Panatier et al., 2011).

En parallèle des mécanismes de facilitation pré- et postsynaptique médiés par le A<sub>2A</sub>R à la synapse glutamatergique, (*décrits ci-dessus*) les astrocytes sont recrutés au niveau de la synapse active. Comme mentionné précédemment, il existe un processus par lequel **l'adénosine relarguée par les astrocytes réduit la libération de glutamate via l'activation des A<sub>1</sub>Rs en présynaptique**. Ce processus est déclenché par l'activation des NMDARs par le glutamate au niveau des synapses excitatrices (Manzoni et al., 1994; Pascual et al., 2005). La présence des astrocytes favorise donc la libération d'ATP et induit une augmentation d'adénosine extracellulaire qui favorise l'inhibition de la neurotransmission médiée par les A<sub>1</sub>Rs dans les synapses environnantes, mais pas au niveau de la synapse activée localement par la signalisation A<sub>2A</sub>. Cette dépression hétérosynaptique permet donc de coder l'information saillante au niveau de la synapse activée par une facilitation locale de la transmission glutamatergique, au sein de multiples synapses pour lesquelles l'inhibition est renforcée par l'action des astrocytes (Serrano, 2006; Andersson et al., 2007). **La libération d'ATP par les astrocytes constitue donc un mécanisme important du cross-talk entre neurones et astrocytes pour affiner la plasticité hétérosynaptique**. De plus, l'ATP relargué par les astrocytes facilite le recrutement des récepteurs P2X aux synapses excitatrices via un mécanisme calcium-dépendant. Lorsque les récepteurs P2X sont activés par l'ATP dérivé des astrocytes ou co-libéré avec le glutamate au niveau présynaptique, les récepteurs NMDARs avec lesquels ils sont colocalisés sont déphosphorylés, via un mécanisme impliquant le calcium et des interactions avec la PSD-95. Il existe donc une **coopération dynamique entre**

**l'ATP neuronal et astrocytaire**, qui module l'efficacité de la synapse via son interaction avec le glutamate (Lalo et al., 2016).



Modulations de la plasticité des synapses médiées par les récepteurs P2X postsynaptiques en réponse à la libération d'ATP par les astrocytes et les neurones (Boué-Grabot and Pankratov, 2017)

### 2.2.2.2. Rôle des $A_{2A}R$ s astrocytaires dans les mécanismes de recapture de neurotransmetteurs

Les astrocytes régulent les concentrations extracellulaires d'ATP mais aussi de glutamate et de GABA, par des mécanismes de recapture des neurotransmetteurs. Les transporteurs de glutamate astrocytaires principaux sont GLAST (glutamate-aspartate transporter) et GLT-1 (glutamate transporter-1). **Les  $A_{2A}R$ s sont exprimés par les astrocytes et leur activation limite la recapture de glutamate via GLT-1 et GLAST en inhibant la pompe  $Na^+/ATPase$**  (Matos et al., 2012, 2013) ce qui affecte la plasticité synaptique et les processus de neurodégénérescence associés à la transmission glutamatergique (Matos et al., 2012). Les transporteurs astrocytaires du GABA sont GAT-1 et GAT-3 (GABA transporters) et **les récepteurs  $A_1R$  et  $A_{2A}R$  respectivement diminuent et augmentent la recapture du GABA par les astrocytes**. De manière intéressante, ce sont des **hétérodimères  $A_1R-A_{2A}R$  présents sur les astrocytes** qui contrôlent, par ces actions opposées, les niveaux de GABA (Cristóvão-Ferreira et al., 2013). Il existe un couplage entre les  $A_{2A}R$ s astrocytaires et la régulation du transport du glutamate et du GABA, et donc de la plasticité des synapses glutamatergiques.

La communication neurogliale est bidirectionnelle. **Les neurotransmetteurs libérés par une synapse active stimulent les récepteurs astrocytaires, ce qui génère des variations de calcium intracellulaire favorisant la libération de gliotransmetteurs qui vont à leur tour moduler l'activité neuronale** (Daré et al., 2007). De manière intéressante, l'ATP libéré par les astrocytes a aussi une action autocrine par l'activation des **récepteurs astrocytaires P2Y1**, ce qui amplifie la libération de glutamate par les astrocytes (Shen et al., 2017).

De plus en plus d'études impliquent les microglies dans la physiologie de la synapse, décrivant une **synapse quadri-partite**. Dans la communication neurones-microglies, l'ATP est un signal important. **Les récepteurs purinergiques P2Y12 sont exprimés par les microglies** (Hickman et al., 2013) et sont essentiels pour l'extension des prolongements microgliaux vers les sources d'ATP (Inoue, 2002; Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2007). **L'activation des P2Y12 microgliaux par l'ATP favorise aussi la libération de BDNF, qui peut moduler l'activité synaptique et la prolifération des microglies.**

**Les microglies peuvent elles-mêmes libérer de l'ATP, en particulier dans des contextes d'inflammation.** L'ATP alors libéré par les microglies active des P2X4s dans l'hippocampe, récepteurs modulant une composante de la plasticité synaptique associée aux NMDARs (George et al., 2016). De plus, l'ATP peut être hydrolysé en adénosine et moduler les récepteurs présents dans les cellules environnantes ou à la synapse. Les microglies expriment des ATPases et 5'-ectonucléotidases à la membrane et peuvent donc moduler la concentration extracellulaire en adénosine (Agostinho et al., 2020).

### **2.2.3. Rôle du A<sub>2A</sub>R dans les microglies**

#### **2.2.3.1. Les récepteurs A<sub>2A</sub> modulent l'activation et la prolifération des microglies**

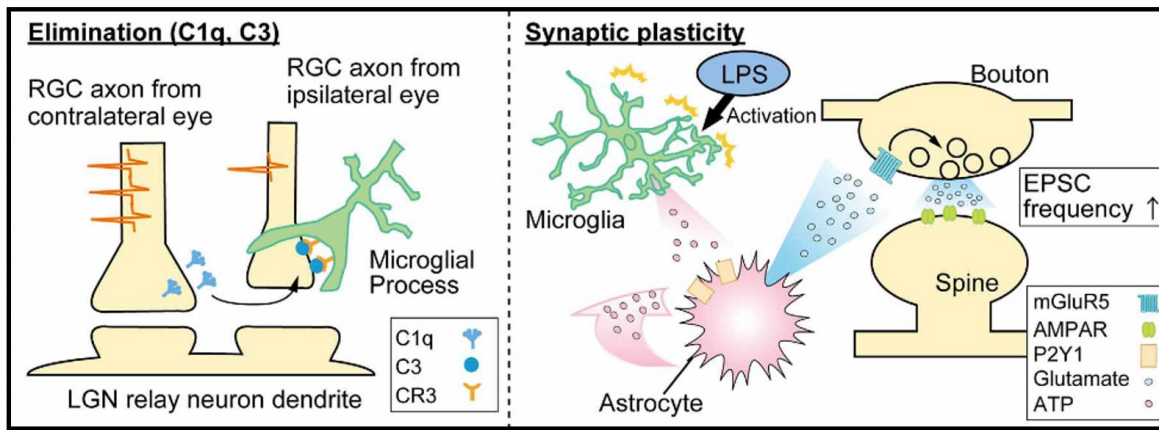
L'expression du A<sub>2A</sub>R dans les microglies augmente dans des conditions où elles sont **activées**. Il existe de nombreux phénotypes de microglies activées, qui présentent une morphologie altérée, expriment des marqueurs d'activation comme **CD68** au niveau de lysosomes, **CD45 à la membrane**, ou les antigènes **MHCII** et produisent des **cytokines pro-inflammatoires** (Tay et al., 2017; Sousa et al., 2018; Bohlen et al., 2019). L'expression des marqueurs de **Cd11b/CR3** et **Iba1** augmente également (Kettenmann et al., 2011). L'activation du A<sub>2A</sub>R dans une microglie activée par les LPS, accentue sa rétractation. Dans ces conditions, le blocage des A<sub>2A</sub>Rs réduit la réactivité de la microglie (Orr et al., 2009). Les LPS favorisent la prolifération des microglies et l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en adénosine. Bloquer les A<sub>2A</sub>Rs ou diminuer la concentration extracellulaire d'adénosine empêche la prolifération des microglies médiée par les LPS (George et al., 2015). Il existerait une coopération entre les A<sub>1</sub>R et les A<sub>2A</sub>Rs pour la régulation de la prolifération des microglies (Gebicke-Haerter et al., 1996).

**Les microglies activées avec des LPS libèrent du BDNF qui facilite la prolifération des microglies. Ces mécanismes sont dépendants de l'activation des A<sub>2A</sub>Rs microgliaux et de la voie AMPc/PKA, et ils ne sont pas observés dans des conditions physiologiques** (Gomes et al., 2013).

### **2.2.3.2. Les A<sub>2A</sub>Rs régulent la libération de signaux inflammatoires par les microglies**

Les A<sub>2A</sub>Rs ont donc été décrits pour contrôler la prolifération des microglies *in vitro* et leur activation. L'activation des A<sub>2A</sub>Rs microgliaux a aussi des effets sur la libération de molécules par les microglies. En effet, elle **facilite la libération de NGF** (nerve growth factor) (Heese et al., 1997), **de cyclooxygénase-2, de prostaglandine E2** (PGE2 (Fiebich et al., 1996) et régule l'expression des **canaux potassiques** par les microglies (Kust et al., 1999; Daré et al., 2007). L'activation des A<sub>2A</sub>Rs **inhibe la production de TNF- $\alpha$  et CXCL10** par les microglies activées, **chimiokines** respectivement impliquées dans la plasticité synaptique et la **neuroinflammation**, (Newell et al., 2015; Liu et al., 2017). Lorsque les microglies sont activées par des lipopolysaccharides (LPS), elles **libèrent du monoxyde d'azote (NO)** et expriment plus de NO-synthase II (NOS II). Dans ces conditions, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs potentialise ces effets (Saura et al., 2005), qui correspondent à un message inflammatoire. À l'inverse, bloquer les A<sub>2A</sub>Rs réduit la neuroinflammation (Madeira et al., 2016). Ces effets ont aussi été montrés *in vivo*, et dépendent de l'environnement local de la microglie. Dans un contexte pro-inflammatoire, les **concentrations extracellulaires en adénosine et en glutamate** sont accrues, et dans ces conditions l'activation des A<sub>2A</sub>Rs favorise l'activité des NOS, induite par les LPS, par une signalisation PKC-dépendante. Lorsque les concentrations en glutamate sont faibles, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs inhibe l'activité des NOS par la voie PKA, au sein d'un système anti-inflammatoire (Dai et al., 2010). La formation de l'inflammasome NLRP3, et la production des ROS (Reactive oxydative species) dépendent de l'activation des A<sub>2A</sub>Rs (Zhao et al., 2019). Si les concentrations de glutamate sont élevées, l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par les A<sub>2A</sub>Rs est levée (Du et al., 2022). Le glutamate participe donc aux **processus de neuroinflammation médiés par la signalisation adénoenergique**, et en particulier par les A<sub>2A</sub>Rs microgliaux (George et al., 2015).

L'activation des microglies peut être à l'origine de nombreux mécanismes dans le SNC, et elle favorise notamment la **libération d'ATP microglial**. Ce dernier est alors **détecté par les récepteurs P2Y1 astrocytaires**, qui amplifient le signal en libérant des gliotransmetteurs comme le glutamate, qui peut se fixer sur les **récepteurs mGluR5 des astrocytes et moduler l'activité neuronale** (Pascual et al., 2012). Ces données appuient une place cruciale de la microglie dans un système de communication complexe entre les cellules gliales et les neurones.



Interaction des microglies avec les synapses via les protéines du complément (gauche) impliquées dans la phagocytose des synapses, et via des facteurs sécrétés lorsque les microglies sont activées (droite). Les  $A_{2A}R$ s pourraient influencer ces deux processus. (Miyamoto et al., 2013)

**L'ATP et l'adénosine extracellulaires favorisent la production de fractalkine** (voir Partie1.) qui module l'activité neuronale, et est un ligand des **récepteurs CX3CR1** microgliaux. Cette interaction peut donc être à l'origine de nombreux processus comme l'activité synaptique ou la neuromodulation (Ragozzino et al., 2006; Piccinin et al., 2010).

#### 2.2.4. Signalisation $A_{2A}R$ dans les oligodendrocytes et au niveau des cellules épithéliales

Les  $A_{2A}R$ s sont aussi impliqués dans la régulation du développement des oligodendrocytes et le maintien de l'intégrité de la **barrière hémato-encéphalique (BHE)**.

##### 2.2.4.1. Les $A_{2A}R$ s régulent la maturation des oligodendrocytes

Les **oligodendrocytes** sont des cellules gliales essentielles à la myélinisation des axones dans le SNC. Ce processus est fondamental pour réguler l'efficacité et la directionnalité de la transmission de l'information au sein des réseaux de neurones. Les  $A_{2A}R$ s sont exprimés par les oligodendrocytes (Stevens et al., 2002). L'activation des  $A_{2A}R$ s inhibe la différenciation des oligodendrocytes en bloquant des courants potassiques impliqués dans ce processus (Coppi et al., 2013). L'activation des  $A_1R$ s des oligodendrocytes a les effets opposés et stimule donc la maturation des oligodendrocytes (Coppi et al., 2015). La régulation de la myélinisation des axones par les oligodendrocytes via les  $A_{2A}R$ s est importante pour comprendre et pallier à des altérations de myélinisation dans des contextes pathologiques comme les TSA ou des lésions de la moelle épinière (Shen et al., 2018).

##### 2.2.4.2. Les $A_{2A}R$ s modulent la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

La BHE est une barrière séparant le micro-environnement du cerveau et la circulation sanguine. Elle est composée de **cellules endothéliales**, associées via des jonctions serrées,



qui expriment des transporteurs spécialisés permettant le passage sélectif de nutriments requis pour l'homéostasie et la fonction neuronales, et bloquant l'entrée de facteurs neurotoxiques. Son efficacité est fondamentale pour le maintien de l'homéostasie dans le SNC (Bynoe et al., 2015).

Les cellules endothéliales expriment des récepteurs à l'adénosine, en particulier le  $A_{2A}R$ , et aussi la 5'-ectonucléotidase CD73 impliquée dans la production d'adénosine. L'activation des  $A_{2A}Rs$  (ou des  $A_1Rs$ ) altère l'expression de certaines **protéines des jonctions serrées comme la claudine-5, ZO-1 et l'occludine**, ce qui augmente la perméabilité de la BHE (Carman et al., 2011). De manière intéressante, dans un contexte pathologique d'encéphalomyélite autoimmune, l'activation des  $A_{2A}R$  a un rôle de protection de la BHE en stabilisant les protéines claudine-5 et ZO-1 des jonctions serrées (Liu et al., 2018).

### **2.2.5. L'adénosine régule de multiples comportements dans l'organisme adulte**

Pour étudier le rôle des  $A_{2A}Rs$  dans le SNC, des modèles de knock-out (KO) ont été générés. Les KO- $A_{2A}R$  globaux n'induisent pas de perturbations phénotypiques sévères, mais ils ont permis de mettre en avant un rôle des  $A_{2A}Rs$  extra-striataux en tant que modulateurs de l'humeur, de la cognition et aussi de la neurodégénération (Shen et al., 2008; Lopes et al., 2021).

#### **2.2.5.1. Rôle du $A_{2A}R$ dans l'apprentissage et la mémoire**

Les  $A_{2A}Rs$  participent aux processus de **plasticité synaptique** (LTP ou LTD) dans l'hippocampe (Rebola et al., 2008), qui sont clés dans les mécanismes de mémoire et d'apprentissage. De nombreux paradigmes existent pour analyser différents types de mémoire. Les modèles KO- $A_{2A}R$  manifestent des altérations de la mémoire, comme une mémoire de travail accrue et une mémoire contextuelle de peur limitée (Lopes et al., 2021).

#### **2.2.5.2. Rôle du $A_{2A}R$ dans les ganglions de la base**

Les  $A_{2A}Rs$  sont fortement exprimés dans le **striatum**, où ils régulent la motricité au niveau des neurones épineux moyens GABAergiques par le contrôle de la fonction des  $D_2Rs$ . Les  $A_{2A}Rs$ , par leur interaction allostérique avec les  $D_2Rs$ , sont associés à la voie indirecte du mouvement (Cui et al., 2013), et **l'activation des  $A_{2A}Rs$  réduit la locomotion** (Salmi et al., 2005; Taura et al., 2018). Les  $A_{2A}Rs$  striataux peuvent donc intégrer les signalisations dopaminergiques et glutamatergiques pour moduler la plasticité synaptique dans le striatum.

#### **2.2.5.3. Rôle de l'adénosine dans la régulation du sommeil et des cycles éveil/sommeil**

Les concentrations extracellulaires en adénosine varient au cours de processus biologiques et jouent un rôle dans les **cycles veille/sommeil**. Dans les phases d'éveil prolongé, les

concentrations extracellulaires d'adénosine augmentent et ont un **effet somnogénique**, et elles diminuent pendant le sommeil (Porkka-Heiskanen et al., 1997). Les A<sub>2A</sub>Rs ont un rôle important dans la promotion du sommeil (Satoh et al., 1998) qui est aussi lié à leur fonction inhibitrice du mouvement dans le striatum (Lazarus et al., 2017, 2019). Ces observations sont intéressantes car au cours du sommeil, un remaniement des synapses a lieu. Le A<sub>1</sub>R a un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie du sommeil (Lopes et al., 2021), mais de manière intéressante, les effets d'éveil médiés par la caféine passent par les A<sub>2A</sub>Rs (Huang et al., 2005). Plus précisément, les **effets stimulants de la caféine** sont médiés par son action antagoniste sur les A<sub>2A</sub>Rs, et ils sont variables entre les individus. Une explication possible pour ces différences interindividuelles est la présence de variants du gène *Adora2a* dans la population, qui peut présenter ou non des perturbations du sommeil après consommation de caféine (Landolt, 2012).

#### **2.2.5.4. Neuroinflammation et neuroprotection**

Au cours de processus de neuroinflammation, le tonus adénoenergique augmente et les A<sub>2A</sub>Rs sont impliqués. La présence de **cytokines pro-inflammatoires** augmente la densité des A<sub>2A</sub>Rs, ce qui suggère que l'expression du récepteur est modifiée dans ces contextes (Trincavelli et al., 2002). Dans l'hippocampe, l'inhibition des A<sub>2A</sub>R empêche la neuroinflammation médiée par les LPS et la dysfonction neuronale subséquente, ce qui pourrait expliquer les **effets neuroprotecteurs des antagonistes des A<sub>2A</sub>Rs** dans de nombreuses pathologies (Rebola et al., 2011; Cunha, 2016). Cette fonction neuroprotectrice est retrouvée dans les modèles KO-A<sub>2A</sub>R (Shen et al., 2008; Lopes et al., 2021). Le A<sub>2A</sub>R favorise la production de facteurs neurotrophiques comme le NGF/BDNF (Borea et al., 2016) et comme mentionné précédemment, la libération de BDNF par les microglies activées lors d'un contexte de neuroinflammation dépend de l'activation des A<sub>2A</sub>Rs, qui auraient donc un rôle de normalisation des activités neuronales en cas de perturbations de l'homéostasie (Gomes et al., 2013).

#### **2.2.6. L'adénosine est impliquée dans de nombreuses pathologies**

Les fonctions physiologiques du A<sub>2A</sub>R décrites précédemment peuvent être altérées au cours de la vie. En dehors du développement post-natal, il existe également un pic hippocampique d'expression des A<sub>2A</sub>Rs au cours du vieillissement et de certaines affections neurodégénératives. Dans ces contextes pathologiques, décrits rapidement ci-après, il existe une corrélation entre l'activité des A<sub>2A</sub>Rs et des altérations des circuits neuronaux et synaptiques (Cunha, 2016).

### 2.2.6.1. A<sub>2A</sub>R et déficits mnésiques

La MA est associée à un phénotype de neuroinflammation et cause des dysfonctions synaptiques, induisant une atrophie cérébrale et un déclin cognitif (Cellai et al., 2018). Dans un **modèle de tauopathie**, l'**augmentation de l'expression du A<sub>2A</sub>R neuronal** potentialise l'hyperphosphorylation de tau et l'apparition des déficits cognitifs. De manière intéressante, la perte de synapses glutamatergiques provoquée dans ce contexte est associée à la surexpression de la protéine du complément C1q (Carvalho et al., 2019). La susceptibilité accrue à des dysfonctions de la mémoire dans la MA peut être expliquée par une modification de la plasticité synaptique médiée par l'augmentation des processus de LTP, liée à la surexpression des A<sub>2A</sub>Rs. Celle-ci passe par l'augmentation de l'efficacité des NMDARs à la synapse ainsi que des courants calciques, par un mécanisme impliquant le récepteur mGluR5 (Temido-Ferreira et al., 2020). Paradoxalement, l'augmentation de l'adénosine, via un inhibiteur de ENT1, retarde la progression de la MA en améliorant la plasticité neuronale (Lee et al., 2018).

Dans des modèles de stress chronique imprédictible, une altération des circuits hippocampiques, de la mémoire et de l'humeur est induite. La **densité des A<sub>2A</sub>Rs aux synapses glutamatergiques est accrue**, et la connectivité synaptique est réduite. Ces effets sont bloqués par des antagonistes du A<sub>2A</sub>R (caféine, KW6002 ou SCH-58261) (Kaster et al., 2015). Pour les maladies associées à l'augmentation de l'expression des A<sub>2A</sub>Rs, l'inhibition de ces derniers a un effet neuroprotecteur. En effet, le blocage des A<sub>2A</sub>Rs réduit la synaptotoxicité et les déficits mnésiques liés à l'administration de peptides A $\beta$  (Canas et al., 2009) et la suppression de A<sub>2A</sub>R dans un modèle de tauopathie protège des altérations de mémoire spatiale et de LTD, et réduit l'hyperphosphorylation de tau (Laurent et al., 2016).

### 2.2.6.2. Maladie de Parkinson et tonus adénoenergique dans le striatum

La **maladie de Parkinson** (MP) est une maladie neurodégénérative qui affecte les neurones dopaminergiques de la substance noire dans le striatum et est caractérisée en partie par des troubles moteurs. Ces symptômes sont liés à une hyperactivité du circuit indirect, composé des D2Rs, hétérodimérisés avec des A<sub>2A</sub>Rs. Les antagonistes du A<sub>2A</sub>R induisent une amélioration motrice. Dans ce cas, **un blocage des A<sub>2A</sub>Rs avec l'istradefylline** (ou KW6002) participe au traitement de la MP (Torti et al., 2018; Chen and Cunha, 2020).

En cas de **stress cellulaire**, les concentrations en ATP extracellulaire augmentent, et l'adénosine réduit l'excitabilité des neurones via les A<sub>1</sub>Rs. Cependant, si le **tonus adénoenergique** est dérégulé de manière chronique, il favorise l'activation des A<sub>2A</sub>Rs qui induit une surexcitabilité des réseaux neuronaux hippocampiques qui est néfaste dans des

pathologies comme l'épilepsie (Tescarollo et al., 2020). Dans un contexte où le tonus adénoenergique est bas, dans le cas de la **maladie d'Huntington**, la neurotransmission est affectée. Les symptômes de cette maladie, caractérisée par une motricité anormale, des altérations cognitives et psychiatriques, et une perte des récepteurs A<sub>2A</sub>Rs et D<sub>2</sub>Rs dans les neurones épineux moyens striato-pallidiaux, peuvent être améliorés en augmentant les niveaux d'adénosine extracellulaire (Blum et al., 2018). Le tonus adénoenergique est maintenu par la libération d'ATP par les astrocytes, et aussi par l'activité des ADK astrocytaires. Ces cellules jouent un rôle important dans la signalisation adénoenergique. Les A<sub>2A</sub>Rs astrocytaires participent notamment à la dérégulation des niveaux extracellulaires de glutamate, par leur association avec GLT-1, et ces dysfonctions glutamatergiques peuvent être associées à la **schizophrénie** (Matos et al., 2015).

### **2.3. La signalisation adénoenergique au cours du développement dans l'hippocampe**

Si le rôle de l'adénosine via ses récepteurs est relativement bien connu chez l'adulte et dans la pathologie (voir ci-dessus), leurs fonctions dans le cerveau en développement restent peu étudiées. Pour déterminer si la signalisation adénoenergique a un rôle au cours de la synaptogenèse, l'analyse du pattern d'expression, des interactions avec d'autres protéines participant à la formation des synapses, et de l'impact de la modulation des voies adénoenergiques sur la formation des réseaux neuronaux, dépendante de l'activité, est nécessaire.

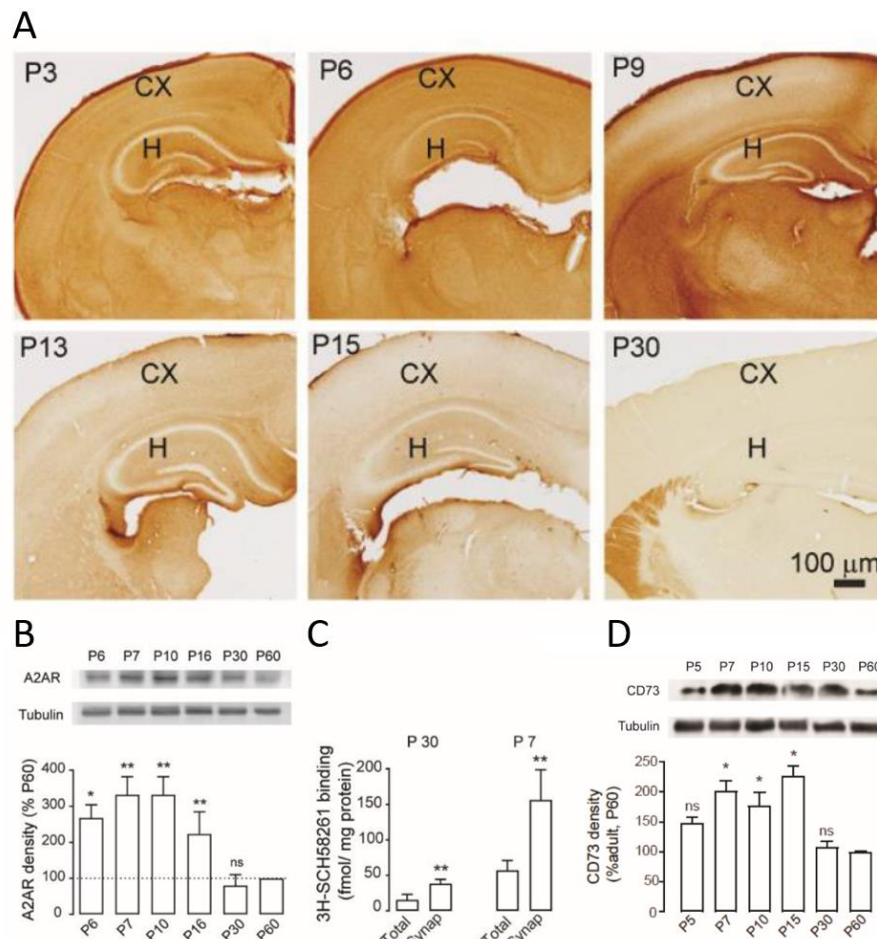
La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique essentiel, qui permet des modifications de l'expression de gènes sans modifier la séquence d'ADN et contrôle l'embryogenèse et la susceptibilité à certaines maladies. Bloquer la signalisation adénoenergique au cours du développement embryonnaire inhibe l'expression d'enzymes clés de la méthylation de l'ADN, ce qui génère des modifications épigénétiques de la fonction cardiaque sur le long-terme (Rivkees and Wendler, 2017) et pourrait altérer d'autres processus notamment dans le SNC.

#### **2.3.1. Expression et localisation de protéines de la signalisation adénoenergique au cours de la synaptogenèse dans l'hippocampe**

Le A<sub>2A</sub>R est détecté dans le cerveau par hybridation in situ à partir du jour embryonnaire 18.5, et son expression dans le cerveau moyen et postérieur **augmente au cours du développement** (P4-P28), diminue au stade adulte (P56) et réaugmente au cours du vieillissement (Allen Brain Atlas: Developing Mouse Brain).

**Au cours de la période de synaptogenèse**, entre les jours postnataux P5 et P16 chez la souris, la **libération activité-dépendante d'ATP et d'adénosine augmente de façon transitoire dans l'hippocampe** (Gomez-Castro et al., 2021). Les **5'-ectonucléotidases**, qui convertissent l'AMP en adénosine, sont exprimées transitoirement à la surface des neurones et aux synapses en développement (Zimmermann et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que CD73 est enrichi aux synapses dans l'hippocampe spécifiquement pendant la période de synaptogenèse (Gomez-Castro et al., 2021). Comme mentionné précédemment, CD73 est associée au A<sub>2A</sub>R.

**Les A<sub>2A</sub>Rs sont enrichis de manière transitoire aux synapses de l'hippocampe au cours de la synaptogenèse.** De plus, ils sont localisés autour de la densité post-synaptique des synapses GABAergiques au cours de la synaptogenèse. Ce pic d'expression transitoire coïncide avec un rôle clé de ce récepteur dans la stabilisation des synapses inhibitrices GABAergiques de l'hippocampe (Gomez-Castro et al., 2021).



Les détections du A<sub>2A</sub>R par immunohistochimie augmentent au cours de la période précoce du développement par rapport aux stades plus tardifs dans l'hippocampe (H) et le cortex (C) (A), Augmentation transitoire des niveaux protéiques de A<sub>2A</sub>R dans l'hippocampe au cours des deux premières semaines postnatales (P6-P16) (B), Expérience de radio-liaison de l'antagoniste sélectif du

A<sub>2A</sub>R, [3H]-SCH58261 dans les membranes totales ou des synaptosomes dans l'hippocampe montrant que les A<sub>2A</sub>Rs sont enrichis aux synapses, particulièrement au cours de la synaptogenèse (P7) (C), La densité de CD73 augmente au cours de la période de synaptogenèse dans les synaptosomes hippocampiques (D) (Gomez-Castro et al., 2021)

## **2.3.2. La modulation de la signalisation adénoenergique au cours du développement précoce module les circuits neuronaux**

### **2.3.2.1. Les A<sub>2A</sub>Rs : à l'origine d'un mécanisme de stabilisation des synapses GABAergiques naissantes**

Un rôle des A<sub>2A</sub>Rs dans la stabilisation des synapses GABAergiques a été décrit (Gomez-Castro et al., 2021). Au cours de la synaptogenèse, lorsque le A<sub>2A</sub>R est bloqué avec l'antagoniste sélectif SCH-58261, la fréquence des courants synaptiques inhibiteurs est réduite *ex vivo*, et les synapses inhibitrices en développement sont déstabilisées, au niveau pré- et postsynaptique *in vitro*. Supprimer le A<sub>2A</sub>R neuronal déstabilise également les synapses GABAergiques, et la structure des synapses est aussi perturbée *in vitro* si l'adénosine ambiante est réduite. Ces effets ont lieu rapidement, en 30 minutes. La formation d'une synapse inhibitrice dure entre 3 à 4 heures, la régulation des synapses inhibitrices par la voie adénoenergique observée correspond donc à des **mécanismes de stabilisation/déstabilisation** plutôt que de formation des synapses.

L'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> au cours du développement induit une augmentation des concentrations intracellulaires en calcium. Les A<sub>2A</sub>Rs sont couplés à des ACs activées par des calmodulines (CaM) calcium-dépendantes, AC1 et AC8 dans l'hippocampe. En fait, **l'activation simultanée des deux récepteurs stimule les ACs de manière additive**, et provoque une augmentation de la production d'AMPc, qui permet d'activer la PKA. La PKA phosphoryle le résidu sérine 303 de la géphyrine, une protéine d'échaffaudage des synapses inhibitrices ce qui permet de stabiliser des synapses inhibitrices. Cette stabilisation est possible par l'ancrage des GABA<sub>A</sub>R au cytosquelette postsynaptique, et l'interaction entre les CAMs transsynaptiques Slitrk3 et PTP-δ. Si la synapse n'est pas active, elle est déstabilisée. Le A<sub>2A</sub>R détecte donc l'activité de la synapse via l'ATP/adénosine co-libérés avec le GABA en présynaptique, et est à l'origine de ce mécanisme de stabilisation (Gomez-Castro et al., 2021).

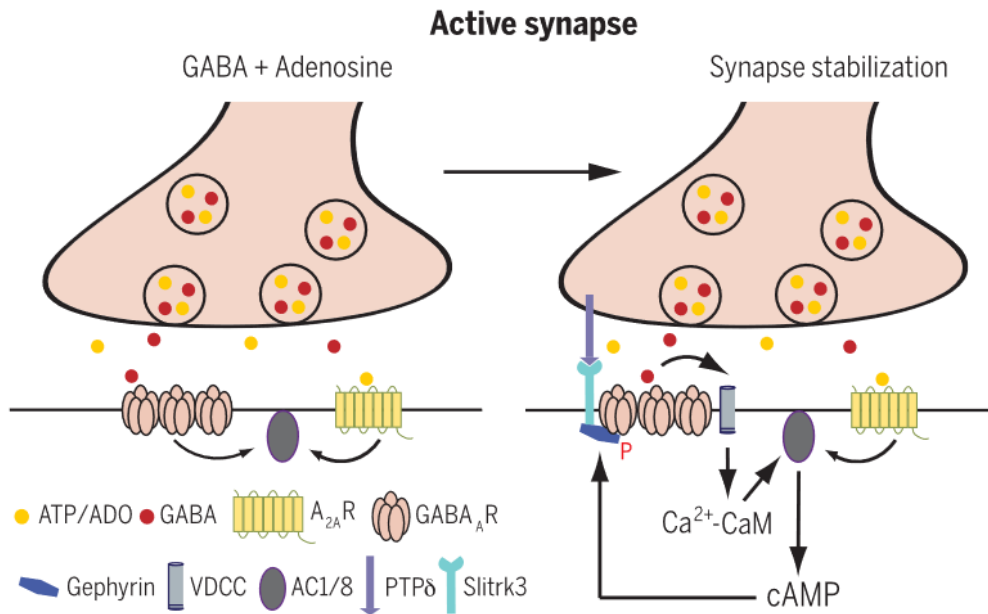


Schéma récapitulatif du mécanisme de stabilisation des synapses GABAergiques naissantes dans l'hippocampe par le A<sub>2A</sub>R neuronal (Gomez-Castro et al., 2021)

De manière intéressante, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs *in vitro* dans des neurones hippocampiques de rat augmente l'expression de PSD-95 à DIV7, et favorise la production de BDNF (Jeon et al., 2011).

Il est intéressant de se demander si la signalisation adénoenergique aurait aussi un rôle dans la **synaptogenèse glutamatergique**.

### 2.3.2.2. Les A<sub>2A</sub>Rs sont impliqués dans la croissance des axones et dendrites

La signalisation adénoenergique contrôle le **guidage axonal** nécessaire à la formation des circuits neuronaux. Dans un modèle de neurones corticaux *in vitro*, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs au cours de la synaptogenèse favorise la croissance axonale en augmentant la **vitesse de polymérisation des microtubules**, par un mécanisme dépendant de PI3K, mais pas du BDNF ou de la PKA. L'activation des A<sub>2A</sub>Rs favorise aussi la production, via la voie Akt/ERK, de BDNF qui participe à la croissance des dendrites et la survie et prolifération neuronales (Jeon et al., 2011; Ribeiro et al., 2016; Rodrigues et al., 2019). Le blocage des A<sub>2A</sub>Rs ou leur suppression induit une diminution de la croissance axonale et une inhibition de la formation des axones, ce qui montre que les A<sub>2A</sub>Rs sont requis pour la formation des axones (Alçada-Morais et al., 2021). La **vitesse de migration des neurones GABAergiques corticaux** issus des éminences ganglionnaires médiales est réduite lorsque le A<sub>2A</sub>R est bloqué (Silva et al., 2013).

### 2.3.2.3. L'adénosine est impliquée dans la migration des neurones inhibiteurs

La transmission synaptique au cours du développement peut réguler plusieurs processus développementaux. Les circuits synaptiques sont précisément mis en place en fonction de l'activité neuronale, et sont centraux dans le maintien d'un équilibre entre l'inhibition et l'excitation. La structuration des réseaux corticaux passe par des **processus dynamiques de migration des neurones GABAergiques ou pyramidaux** qui s'organisent en strates dans le cortex. *In vivo*, les interneurons corticaux migrent de manière tangentielle vers une zone cible du cortex, tandis que les neurones pyramidaux excitateurs envahissent le cortex par migration radiale. **Les A<sub>2A</sub>Rs contrôlent la migration tangentielle des interneurons** à projection, notamment à somatostatine (SOM), qui jouent un rôle important dans la formation des réseaux corticaux. L'activation des A<sub>2A</sub>Rs par l'adénosine dérivée de l'ATP extracellulaire contribue à la migration de ces neurones en contrôlant leur polarisation ainsi que la formation et croissance des axones (Alçada-Morais et al., 2021). Le blocage des A<sub>2A</sub>Rs au cours de la période périnatale perturbe la migration et l'insertion des neurones GABAergiques dans les couches corticales hippocampiques. Les interneurons à SOM sont affectés en particulier, et ils expriment le A<sub>2A</sub>R au niveau d'un prolongement cellulaire essentiel à la migration des neurones (Silva et al., 2013). La signalisation purinergique pourrait donc intégrer des signaux à différentes étapes de la migration radiale via des gradients contrôlés d'ATP et d'adénosine.

### 2.3.2.4. Bloquer les A<sub>2A</sub>Rs au cours du développement altère la formation des circuits neuronaux hippocampiques

Bloquer la fonction des A<sub>2A</sub>Rs spécifiquement au cours du développement permet de comprendre leurs effets au long terme dans le contrôle de la migration des interneurons et des neurones principaux, et dans la mise en place des circuits neuronaux. Plusieurs études traitent de cette thématique développementale de l'adénosine en utilisant des modèles d'**administration de caféine**, un antagoniste non-sélectif naturel des récepteurs à l'adénosine qui passe la BHE, **au cours de la période périnatale**.

**La caféine est la substance psychoactive la plus consommée dans le monde**, et cette activité psychotrope est attribuée à sa fonction d'antagoniste des A<sub>1</sub>Rs et A<sub>2A</sub>Rs (Fredholm et al., 2005). L'étude des effets de la caféine au cours du développement des réseaux neuronaux répond donc à des questions mécanistiques sur le rôle de l'adénosine au cours de cette période mais aussi de santé publique, sur la consommation de boissons caféinées au cours de la grossesse.

La caféine, administrée oralement à des souris au cours de la gestation et de la lactation, à des doses correspondant à l'équivalent de 3-4 tasses de café chez l'humain, provoque chez la descendance une augmentation de l'activité des réseaux et des synapses glutamatergiques



et GABAergiques à P6. Cette **hyperexcitabilité des réseaux neuronaux hippocampiques** est associée à une **susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie** chez ces animaux. De manière intéressante, ces résultats sont répliqués avec un antagoniste spécifique du A<sub>2A</sub>R (KW6002). Sur le long terme, le blocage des A<sub>2A</sub>Rs au cours du développement altère la balance excitation/inhibition dans le cerveau adulte, suggéré par la **diminution du nombre d'interneurones GABAergiques**, notamment à SOM, et l'hypoactivité des réseaux glutamatergiques. La consommation de caféine au cours de ces phases périnatales altère aussi la construction des réseaux GABAergiques du cortex visuel (Fazeli, 2017). Ce déséquilibre au sein des réseaux corticaux peut expliquer les **déficits de mémoire** observés chez ces animaux (Silva et al., 2013). Ces déficits de mémoire ont été suggérés plus présents chez les femelles que chez les mâles. Si les animaux sont traités avec de la caféine après le sevrage, en plus de la période périnatale, ces déficits sont annulés. La caféine induit l'augmentation des niveaux de BDNF dans l'hippocampe, ce qui améliore les performances mnésiques et augmente aussi la locomotion (Ardais et al., 2016). L'administration de doses plus importantes de caféine au cours du développement réduit la croissance des jeunes descendants. Ces animaux au stade adulte présentent des troubles d'apprentissage et de mémoire, liés à la **réduction des voies de signalisation adénosinergiques, AMPc/PKA/CREB**, qui étaient activées plus tôt dans le développement, **et une baisse de l'expression de BDNF/TrkB** (Li et al., 2018). Si l'exposition périnatale à la caféine induit une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie, liée à l'altération des réseaux glutamatergiques et GABAergiques, elle favorise aussi l'évolution de la pathologie Tau dans un modèle de la MA. La signalisation adénosinergique pourrait donc participer à la survenue précoce de symptômes cognitifs de la MA (Zappettini et al., 2019).

De manière intéressante, **une exposition transitoire à la caféine au cours de la période de synaptogenèse uniquement entraîne des déficits cognitifs**. Plus spécifiquement, le blocage pharmacologique de A<sub>2A</sub>R avec le SCH-58261 au cours de la synaptogenèse suffit à induire une perte de synapses GABAergiques ainsi que des déficits de mémoire spatiale. La suppression du récepteur A<sub>2A</sub> dans l'hippocampe entre P3 et P21 par une approche virale utilisant des shARN induit une altération des synapses inhibitrices (Gomez-Castro et al., 2021). **La signalisation médiée par les A<sub>2A</sub>Rs est donc cruciale au cours de la période postnatale de synaptogenèse.**

### **2.3.2.5. Le A<sub>2A</sub>R régule-t-il l'élagage de synapses médié par les microglies ?**

Le blocage pharmacologique du A<sub>2A</sub>R ou son KO au cours du développement dans le cortex préfrontal ou l'hippocampe dorsal modifie la morphologie des microglies de manière sexe- et région-spécifique (Simões-Henriques et al., 2020). Un rôle des A<sub>2A</sub>Rs dans l'élagage des synapses par les microglies a récemment été décrit dans le système visuel au cours du

développement. **Le blocage du A<sub>2A</sub>R** avec du KW6002 entre P2 et P4 facilite l'élagage des synapses à P5, par des mécanismes **d'activation microgliale**, une activité lysosomale et une phagocytose des synapses accrues, mais pas à P10. La densité de protéines postsynaptiques (mGluR5, Homer1) et la colocalisation entre VGLUT2 et Homer1 diminuent. L'effet observé est **transitoire** et correspond au **pic de l'élagage des synapses dans le dLGN** (Miao et al., 2021). Ces résultats suggèrent que le A<sub>2A</sub>R pourrait contrôler l'élimination des synapses en modulant la phagocytose des synapses par les microglies, ou par un effet postsynaptique sur l'efficacité des synapses du dLGN. Pourtant, le **modèle KO-A<sub>2A</sub>R** présenté dans cette étude présente un phénotype inverse au modèle de blocage pharmacologique à P5, c'est-à-dire une phagocytose, i.e. une activité lysosomale, réduite des synapses. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que le KO-A<sub>2A</sub>R peuvent présenter des **altérations développementales** des processus régulés par le A<sub>2A</sub>R décrits ci-dessus, entre les stades embryonnaires et postnataux. Comme mentionné précédemment, les effets synaptiques du A<sub>2A</sub>R pourraient être différents sur les synapses glutamatergiques ou GABAergiques, médiés ou non par les microglies, et variés en fonction des régions cérébrales (Favuzzi et al., 2021). De plus, l'approche du KO cible tous les types cellulaires alors que le blocage pharmacologique du A<sub>2A</sub>R peut affecter différenciellement les cellules neuronales, gliales ou endothéliales, et provoquer des effets hétérogènes. **Ce papier met en avant un rôle clé du A<sub>2A</sub>R dans le contrôle de la stabilité des synapses par les microglies au cours du développement postnatal.**

Les données de la littérature montrent donc que des interactions neurogliales favorisent la formation et la stabilisation des synapses, ou leur déstabilisation et élimination subséquente. Le récepteur A<sub>2A</sub> est un régulateur fin de la plasticité synaptique chez l'adulte mais son rôle au cours du développement reste peu exploré. Sa localisation et ses fonctions dans les cellules neuronales et non-neuronales suggèrent plusieurs mécanismes d'interaction possibles, et l'augmentation de son expression au cours de la synaptogenèse dans l'hippocampe, concomitante avec une régulation active des réseaux neuronaux par les cellules gliales, indique un rôle notable du A<sub>2A</sub>R pendant cette période développementale.

## OBJECTIFS DE LA THESE

Le récepteur A<sub>2A</sub> est au cœur de nombreuses voies de signalisation. Sa structure particulière de RCPG, la distribution de son expression dans le SNC et dans différents types cellulaires lui confère de multiples potentialités de régulation des mécanismes complexes dans le cerveau, dans des conditions physiologiques ou pathologiques. La diversité des interactions du A<sub>2A</sub>R avec des partenaires protéiques ou les caractéristiques de son environnement local, et spécifiquement la concentration extracellulaire en adénosine, apporte d'autant plus de possibilités quant à la fonction de ce récepteur

Au cours de la période de développement postnatal, les processus de formation et d'élimination des synapses sont cruciaux pour la mise en place de réseaux neuronaux fonctionnels et homéostatiques. Plus spécifiquement, des modulations fines des synapses inhibitrices ou excitatrices au cours de cette période peuvent impacter la connectivité des neurones sur le long terme.

Le rôle du récepteur A<sub>2A</sub> au cours de la période de synaptogenèse dans l'hippocampe et au niveau de la mise en place des circuits neuronaux est peu connu. Comme décrit dans l'introduction, un mécanisme de stabilisation des synapses GABAergiques naissantes par la signalisation adénoenergique dans l'hippocampe a été détaillé dans le laboratoire et implique des acteurs neuronaux (Gomez-Castro et al., 2021). D'autres fonctions développementales ont été observées, mais de nombreux effets du A<sub>2A</sub>R restent à étudier au cours de la période périnatale.

L'objectif de la thèse est de disséquer les mécanismes neurogliaux par lesquels le A<sub>2A</sub>R régule la stabilisation des synapses glutamatergiques de l'hippocampe au cours du développement. La première étape a été de mettre en avant la présence des A<sub>2A</sub>Rs aux synapses glutamatergiques et dans les cellules gliales dans des modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*. Puis, les effets de l'activation du récepteur sur les synapses et les récepteurs glutamatergiques ont été testés dans le modèle *in vitro*. Enfin, l'implication relative des cellules neuronales et gliales dans la régulation des synapses glutamatergiques par le A<sub>2A</sub>R a été étudiée, ainsi que les pistes mécanistiques à l'origine de ces interactions neurogliales. La régulation observée a été validée *in vivo*.

Ces travaux de thèse mettent l'accent sur un rôle fin du récepteur A<sub>2A</sub> associé aux cellules gliales dans les processus de stabilisation ou déstabilisation des synapses glutamatergiques dans l'hippocampe au cours de la période de synaptogenèse. Cette fonction du A<sub>2A</sub>R peut être

la source de dérèglements synaptiques dans des contextes physiologiques de plasticité au stade adulte ou au cours du vieillissement, ou des contextes pathologiques.

## **MATERIEL ET METHODES**

### **Cultures primaires de neurones hippocampiques.**

Pour toutes les expériences réalisées sur des cultures primaires de neurones hippocampiques, les procédures animales ont été effectuées conformément à la directive du Conseil de la Communauté européenne du 24 novembre 1986 (86/609/CEE), aux directives du ministère français de l'Agriculture et à la Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris (Institut du Fer à Moulin, Animalerie des Rongeurs, licence C 72-05-22). Tous les efforts ont été faits pour minimiser la souffrance des animaux et pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Les cultures primaires de neurones hippocampiques de rat ont été préparées comme décrit précédemment (Battaglia et al., 2018) à partir d'embryons de rats Sprague-Dawley. Les hippocampes ont été disséqués au jour embryonnaire 18 ou 19 sans distinction de sexe. Le tissu a été trypsinisé (0,25% v/v) et dissocié mécaniquement dans du milieu HBSS 1X (Invitrogen) contenant 10mM d'HEPES (Invitrogen). Les neurones ont été ensemencés à une densité de  $2.3 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur des lamelles en verre de 18mm de diamètre (Invitrogen) préincubées avec 55µg/mL de poly-D,L-ornithine (Sigma-Aldrich), permettant l'adhésion des cellules, dans un milieu d'attachement composé de MEM (Sigma) supplémenté avec du sérum de cheval (10% v/v), de la L-glutamine (2mM) et du sodium pyruvate (1mM, Invitrogen). Après 3-4h d'attachement, les cellules ont été incubées et maintenues dans un milieu de culture Neurobasal (ThermoFisher) supplémenté avec du B27 (1X), de la L-glutamine (2mM) et des antibiotiques (pénicilline 200u/mL, streptomycine, 200µg/mL, Invitrogen) entre 3 et 21 jours à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% CO<sub>2</sub>. Le B27 remplace le sérum et augmente considérablement la survie des neurones, qui peuvent être conservés jusqu'à plus de 3 semaines en culture. Chaque semaine, 1/3 du milieu de culture a été renouvelé.

### **Transfection des neurones.**

Les neurones ont été transfectés à DIV3 (day in vitro 3) pour les expériences de suivi de molécules uniques et DIV6 pour les autres expériences, en utilisant de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou de la transfectine (Bio-Rad, Hercules, USA), en suivant les instructions des fabricants (ratio ADN/lipofectant 1:3µg/µL), avec 0.5 ou 1µg de plasmide d'ADN par puits. Les plasmides utilisés sont les suivants : shARN contre le A<sub>2A</sub>R (Gomez-Castro et al., 2021), shARN non-target, eGFP, A2AR-GFP, Homer DsRed, GluA1-SEP, PSD-95.FingR (Gross et al., 2013), mCherry, pcX-LynLyn-cAMP Sponge-mCherry, pcX-cAMP Sponge-mRFPKras, pcX-LynLyn-cAMP Sponge mutated (toutes les éponges ont été fournies par Xavier Nicol, Institut de la Vision, Paris, France (Averaimo et al., 2016)). Les plasmides ont été utilisés à 0.5µg pour mCherry et eGFP, 1µg pour PSD-95.FingR et A2AR-GFP. Les ratio de plasmides

suyvants ont été utilisés pour les co-transfections : 1:0.5µg pour GluA1-SEP:Homer-DsRed ; 1:0.2µg pour shNT ou shA2A : eGFP ; 0.5µg pour eGFP ; 0.5:0.2:0.5µg pour shNT ou shA2A : eGFP : pcX-LynLyn-cAMP Sponge-mCherry ; 0.5µg pour pcX-LynLyn-cAMP Sponge-mCherry, 0.5µg pour pcX-LynLyn-cAMP Sponge mutated, 0.25µg pour pcX-cAMP Sponge-mRFPKras. Les expériences ont été réalisées 3-7 jours après la transfection.

### **Traitements pharmacologiques in vitro.**

**Pour déterminer les effets de la voie adénoenergique sur la densité de synapses glutamatergiques en immunocytochimie**, le SCH-58261 (100 nM ou 500nM, Abcam), CGS-21680 (30 nM, Abcam), adenosine deaminase (ADA, 4-20 U/mL, Roche), AMPCP (85 µM, Sigma), DPCPX (100 nM, Merck), CPA (10nM, Sigma), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 100 µM, Tocris), Forskolin (FSK, 10 µM, Tocris), CALP3 (100 µM, Tocris), SQ22536 (20 µM, Sigma) ont été ajoutés directement dans le milieu de culture et les neurones replacés dans l'incubateur à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 30 minutes, ou 1heure en présence ou non de l'anticorps bloquant C1q (1 :1000, Abcam).

Pour déterminer la contribution des astrocytes et des microglies dans la stabilisation des synapses glutamatergiques, les cellules ont été traitées avec la cytosine arabinoside (ara-C, 5µM, Sigma) à DIV1 et les traitements pharmacologiques adéquats ajoutés à DIV8 pendant 30 minutes.

Pour déterminer la contribution des microglies dans la stabilisation des synapses glutamatergiques, le PLX-5622 a été ajouté directement au milieu de culture à DIV7 (PLX, 2 µM, Clinisciences), puis DIV8 et 1 heure avant la fixation à DIV9 (Garcia-Agudo et al., 2019; Liu et al., 2019). En parallèle, des cellules étaient exposées au L-leucine méthylester (LME) pour éliminer les microglies. Dans ces expériences, le milieu conditionné par les neurones a été retiré et conservé. Les neurones ont été traités pendant 1 heure avec du L-leucine méthylester (LME, 75mM, Sigma–Aldrich) dans du milieu de culture à 37°C (Hamby et al., 2006; Jebelli et al., 2015). Après le traitement, le milieu a été retiré avant l'ajout d'ADA, AMPCP, CGS pendant 30 minutes (aux concentrations décrites précédemment) dans le milieu conditionné.

**Pour les expériences de diffusion des sous-unités GluA1 des récepteurs AMPA en suivi de molécules uniques**, les neurones ont été marqués dans un milieu pour l'imagerie (voir rubrique SPT pour le protocole et la composition du milieu) à 37°C, traités avec du SCH-58261 (100 nM, Abcam), CGS21680 (30 nM, Abcam), ADA (4-20 U/mL, Roche) et AMPCP (85 µM, Sigma) puis transférés dans une chambre d'enregistrement, imagés à partir de 10 minutes et pendant 30 minutes à 33°C dans le milieu d'imagerie en présence des différents traitements.

## **Immunocytochimie.**

**Pour marquer et quantifier la densité des synapses ou récepteurs glutamatergiques *in vitro***, les neurones ont été fixés après les traitements pharmacologiques pendant 10 minutes à -20°C avec du méthanol (VWR Chemicals). Les cellules ont été rincées une fois avec du PBS1X et une goutte de triton X-100 (Carl Roth) puis 3 fois dans du PBS1X. Les cellules ont été incubées dans une solution de « blocage » >30 minutes dans du sérum de chèvre (GS, 3% v/v, Invitrogen) dilué dans du PBS1X pour limiter le marquage non spécifique. Les neurones ont ensuite été incubés pendant 2h à RT avec un mix contenant les anticorps primaires anti-VGLUT1 (lapin, 1:500, Synaptic Systems) et anti-PSD95 (souris, 1:175, Invitrogen) ou anti-NR1 (souris, 1 :200, Abcam) dans du PBS1X supplémenté en GS (3% v/v, Invitrogen). Après 3 rinçages, les neurones ont été incubés pendant 45 minutes à RT dans un mix d'anticorps secondaires adéquats, centrifugés pendant 5 minutes à 6000rpm : chèvre anti-lapin-FITC (GaR, 1:400, Jackson Immunoresearch) et chèvre anti-souris-Cy3 (GaM, 1:400, Jackson Immunoresearch) dans une solution de PBS-GS3%. Ils ont été rincés et les lamelles montées sur lame avec du Mowiol 4-88 (48 mg/mL, Sigma). Les neurones issus d'une même expérience ont été marqués simultanément afin de les comparer lors des quantifications. Les incubations avec les anticorps primaires ou secondaires se font toujours dans une solution de PBS-GS3%.

Pour le marquage du GluA1, les cellules ont été fixées avec du PFA4% + sucrose (14% w/v, Sigma) dilué dans du PBS1X pendant 10 minutes à RT, puis rincées 2 fois. Les cellules ont été incubées dans une solution de sodium citrate (50mM, pH6) pendant 10 minutes à température ambiante (RT) pour démasquer les épitopes. Elles ont ensuite été perméabilisées 4 minutes dans du triton X-100 (0.25% w/v Carl Roth) dilué dans du PBS1X, et rincées 3 fois avant la suite du protocole. Les cellules ont été incubées avec un anticorps primaire anti-GluA1 (lapin, 1:200, Millipore) pendant 1h à RT, rincés 3 fois et incubés pendant 45 minutes à RT avec les anticorps chèvre anti-lapin-Cy3 (GaR-Cy3, 1:400, Jackson Immunoresearch).

**Pour la quantification de la densité de synapses dans les neurones transfectés**, les neurones ont été fixés dans un premier temps avec du PFA4% + sucrose (14% w/v, Sigma) dilué dans du PBS1X pendant 10 minutes à RT, puis rincés 2 fois avec du PBS1X et fixés à nouveau dans du méthanol (VWR Chemicals) pendant 10 minutes à -20°C, puis rincés et marqués comme décrit précédemment. Cette double fixation permet d'éviter la perte de la fluorescence de la GFP transfectées (quench) suite à une fixation avec du méthanol. Les anticorps secondaires pour révéler l'anti-VGLUT1 sont un Fab (chèvre anti-lapin, 1:400, Jackson Immunoresearch) pendant 45minutes puis la streptavidine-Alexa350 (1:400, Jackson Immunoresearch) pendant 30 minutes.

**Pour la caractérisation des différents types cellulaires dans les cultures**, les cellules ont été fixées avec du PFA4% + sucrose (14% w/v, Sigma) dilué dans du PBS1X pendant 10 minutes à RT, puis rincées 2 fois. Elles ont ensuite été perméabilisées 4 minutes dans du triton X-100 (0.25% w/v Carl Roth) dilué dans du PBS1X, et rincées 3 fois avant la suite du protocole (comme décrit précédemment). Les neurones ont été incubés 1 heure à RT dans un mix d'anticorps primaires anti-MAP2 (cochon d'inde, 1:1000, Synaptic Systems), anti-GFAP (souris, 1:500, Synaptic Systems) et anti-Iba1 (lapin, 1:750, Wako). Après 3 rinçages, les cellules ont été incubées pendant 45 minutes à RT dans un mix d'anticorps secondaires adéquats : âne anti-cochon d'inde-Cy3 (DaGP-Cy3, 1:400, Jackson Immunoresearch), chèvre anti-souris-405 (GaM-405, 1:400, Jackson Immunoresearch) et âne anti-lapin-Alexa488 (DaR-488, 1:400, Jackson Immunoresearch). Les cellules ont été rincées et les lamelles montées sur lame avec du Mowiol 4-88 (48 mg/mL, Sigma).

**Pour la colocalisation de A<sub>2A</sub>R aux synapses glutamatergiques en microscopie en PALM/STORM**, la fixation et le protocole sont les mêmes que ci-dessus, sauf que les solutions contenant du GS sont préparées à 10%. Les neurones, transfectés avec PSD-95.FingR, ont été incubés avec un anticorps primaire anti-A<sub>2A</sub>R (lapin, 1:100, Alomone labs) pendant 1h à RT, rincés 3 fois et incubés pendant 45 minutes à RT avec les anticorps chèvre anti-lapin-Cy3 (GaR-Cy3, 1:300, Jackson Immunoresearch). Les cellules sont rincées et placées dans une chambre pour l'imagerie sur le microscope STORM (voir rubrique PALM/STORM).

**Pour la détection des A<sub>2A</sub>R aux synapses glutamatergiques au cours de la synaptogenèse**, les cellules ont été fixées avec du PFA, perméabilisées et bloquées (comme décrit précédemment). Les neurones ont d'abord été incubés 1 heure à RT avec l'anticorps primaire anti-A<sub>2A</sub>R (lapin, 1:100, Alomone labs) et anti-VGLUT1 (cochon d'inde, 1:500, Synaptic Systems), puis, après 3 rinçages, pendant 45 minutes avec les anticorps secondaires chèvre anti-lapin (GaR-Cy3, 1:400, Jackson Immunoresearch) et âne anti-cochon d'inde-Alexa488 (Dagp-488, 1:400, Jackson Immunoresearch).

**Pour la détection des A<sub>2A</sub>R dans les microglies ou les astrocytes au cours de la synaptogenèse**, les cellules ont été fixées avec du PFA, perméabilisées et bloquées (comme décrit précédemment). Les marquages ont été réalisés en séquentiel car les anticorps anti-A<sub>2A</sub>R et anti-Iba1 ont été produits dans la même espèce hôte. Les neurones ont d'abord été incubés 1 heure à RT avec l'anticorps primaire anti-A<sub>2A</sub>R (lapin, 1:100, Alomone labs), puis les anticorps secondaires composés de fragments Fab-Cy3 (chèvre anti-lapin, 1:400, Jackson Immunoresearch) pendant 45 minutes et, après 3 rinçages, Fab-non conjugué (chèvre anti-lapin, 1:400, Jackson Immunoresearch) pendant 45 minutes pour bloquer les sites non spécifiques. Les neurones ont ensuite été incubés 1 heure à RT dans un mix d'anticorps primaires anti-GFAP (souris, 1:500, Synaptic Systems) et anti-Iba1 (lapin, 1:750, Wako). Après



3 rinçages, les cellules ont été incubées pendant 45 minutes à RT avec les anticorps secondaires chèvre anti-souris-405 (GaM-405, 1:400, Jackson Immunoresearch) et âne anti-lapin-488 (DaR-488, 1:400, Jackson Immunoresearch).

### **Acquisitions d'images en microscopie à fluorescence standard et analyses d'images.**

L'acquisition des images a été réalisée sur un microscope droit DM6000 à épifluorescence de Leica (Nussloch, Allemagne), avec un objectif 63X (ouverture numérique 1.40) et une caméra 12-bit CCD (Micromax, Roper Scientific) dirigée par le logiciel MetaMorph (Version 7.7, Roper Scientific, Evry, France). Le temps d'exposition a été déterminé sur des cellules avec un marquage de forte intensité, pour obtenir le meilleur ratio fluorescence/bruit et éviter la saturation des pixels. Toutes les images d'une culture donnée ont été acquises avec les mêmes paramètres d'acquisition et le même jour.

Les quantifications ont été effectuées en double aveugle sur le logiciel MetaMorph (version 7.7, Roper Scientific). Pour l'analyse des clusters, une dendrite primaire a d'abord été sélectionnée et une région d'intérêt (ROI) tracée manuellement. La ROI commençait systématiquement après le corps cellulaire du neurone et la plus grande portion isolée et distincte de dendrite a été choisie (~40-200µm). Les images ont été filtrées en lissant le fond (filtre 3x3x2) pour renforcer les contours des clusters, et un seuil d'intensité a été appliqué pour sélectionner les clusters et éviter la fusion de clusters distincts. Les clusters ont été délimités et considérés comme tels à partir de 2 pixels, et sur les ROIs sélectionnées, le nombre moyen, l'aire et l'intensité de fluorescence des clusters ont été calculés. Pour VGLUT1, les tailles de clusters étaient toujours bien plus importantes que 3 pixels, et les marquages diffus n'étaient pas considérés car pouvant correspondre à des paquets mobiles dans la dendrite. Pour les quantifications de colocalisation entre les clusters de VGLUT1 et PSD-95, GluA1 ou NR1, ces derniers, avec une taille minimale de 2 pixels et une superposition d'1 pixel au moins, ont été comptés comme colocalisés à la synapse. La longueur de la dendrite sur la ROI a été mesurée pour estimer le nombre de clusters, synaptiques ou non, sur 100 µm. Pour chaque culture, plus de 10 neurones ont été analysés par condition expérimentale. La densité de synapses étant variable entre les cultures, le nombre de clusters pour 100 µm dans chaque culture a été normalisé par rapport aux valeurs des conditions contrôle respectives, ce qui permet la comparaison des données entre les cultures.

### **Suivi de molécules uniques (single-particle tracking, SPT) et analyses.**

Les neurones ont été marqués comme décrit précédemment (Bannai et al., 2006; Battaglia et al., 2018). Brièvement, les cellules ont été incubées dans un milieu pour l'imagerie pendant 5 minutes à 37°C avec un anticorps anti-GFP (souris, 1 :1000, Roche) puis rincées plusieurs

fois. Le milieu d'imagerie contient du milieu minimal essentiel (MEM) sans phénol rouge supplémenté avec du glucose (33 mM, Sigma), de l'Hepes (20 mM), de la glutamine (2 mM), du Na<sup>+</sup>-pyruvate (1 mM) et du B27 (1X) (Invitrogen). Les neurones sont ensuite incubés pendant 1 minute avec des fragments F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps secondaires couplés à des quantum dots (QDs) émettant à 655nm (chèvre anti-souris, 1 :500, 2nM Invitrogen) dans un milieu contenant 10% (v/v) de caséine (Sigma). Après plusieurs rinçages (6-7) dans le milieu d'imagerie, les neurones sont transférés dans une chambre d'enregistrement. Les cellules ont été imagées comme décrit précédemment (Battaglia et al., 2018), avec un microscope inversé Olympus IX71 équipé d'un objectif 60X (ouverture numérique 1.42, Olympus) et un monochromateur Lambda DG-4 (Sutter Instrument). Les images de Homer-DsRed et l'enregistrement en temps réel des QDs fixés sur GluA1 (temps d'intégration 30ms sur 1200 images consécutives) ont été acquises avec une caméra Hamamatsu ImagEM EMCCD et le logiciel MetaVue (Meta Imaging 7.8). Les cellules ont été imagées à partir de 10 minutes après le marquage et le traitement, pendant 30 minutes.

Le suivi des QDs et la reconstruction de leurs trajectoires ont été réalisés avec un logiciel Matlab personnalisé (The Mathworks, Natick, MA) (Bannai et al., 2006; Battaglia et al., 2018). Pour une cellule, une ou deux sous-régions des dendrites imagés ont été quantifiées. Les trajectoires des QDs qui se croisaient ont été écartées de l'analyse. Les trajectoires synaptiques ou extrasynaptiques ont été caractérisées respectivement par leur superposition ou une distance de 2 pixels (380nm) avec le masque synaptique Homer-DsRed (Lévi et al., 2008). Les valeurs du déplacement carré moyen (MSD) en fonction du temps ont été calculées pour chaque trajectoire en appliquant la relation suivante :

$$MSD(n\tau) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} \left[ \left( x((i+n)\tau) - x(i\tau) \right)^2 + \left( y((i+n)\tau) - y(i\tau) \right)^2 \right],$$

dans laquelle  $\tau$  est le temps d'acquisition,  $N$  est le nombre total d'images,  $n$  et  $i$  sont des nombres entiers positifs,  $n$  définissant l'incrément temporel (Saxton and Jacobson, 1997). Les coefficients de diffusion ( $D$ ) ont été calculés en ajustant les quatre premiers points sans origine de la courbe « MSD vs. temps » avec l'équation :  $MSD(n\tau) = 4Dn\tau + b$ , où  $b$  est une constante reflétant la précision de la localisation des points. Le temps de résidence synaptique a été défini comme la durée de détection des QDs aux synapses sur un enregistrement, divisée par le nombre de sorties comme détaillé précédemment. Les temps de résidence < 5 images n'ont pas été retenus pour l'analyse. L'aire explorée de chaque trajectoire a été définie comme la valeur MSD de la trajectoire à deux intervalles de temps différents de 0.42 et 0.45s.

## **Imagerie à super-résolution PALM/STORM.**

L'imagerie PALM (Photo-Activable Localization Microscopy) / STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) a été réalisée sur des cellules fixées (voir la rubrique immunocytochimie), sur un microscope inversé N-STORM Nikon Eclipse Ti avec un objectif 100X à huile (ouverture numérique NA 1.49) et une caméra Andor iXon Ultra EMCCD (taille du pixel 160nm). Des lasers spécifiques pour l'imagerie PALM de FingR (PSD-95, 405 et 561nm) et STORM du Alexa Fluor 647 (A2AR, 647nm). Les films pointillistes de 10 000 images ont été acquis à une cadence de 50ms. Le « perfect focus system » de Nikon permet de maintenir la mise au point axiale (position z) au cours de l'acquisition. L'imagerie STORM/PALM a été réalisée séquentiellement. La localisation de molécules individuelles et la reconstruction d'images 2D ont été effectuées comme décrit dans le papier de Specht et al. (Specht, 2013), en faisant correspondre la fonction d'étalement du point (point spread function, PSF) des fluorophores séparés spatialement à une distribution Gaussienne en 2D. Le mouvement relatif de billes (100 nm, TetraSpeck) a été utilisé pour corriger la dérive de la position du fluorophore en x/y au cours de l'acquisition (généralement <200nm). Les images PALM et STORM ont été reconstituées en superposant les coordonnées des détections de molécules individuelles, représentées par des courbes Gaussiennes en 2D de leurs intensités unitaires, et les déviations standards (représentant la précision de la localisation, ~20nm).

## **Extraction de protéines et Western blot du A2AR.**

Les cellules de même culture à DIV3, 5, 7, 14, 21 ou 28 ont été rincées une fois avec du PBS1X préchauffé à 37°C, puis placées sur glace pour la suite du protocole. Les cellules ont été lysées avec un grattoir et un tampon de lyse (RIPA pH8, composé de 50mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% déoxycholate de sodium, 1% NP-40 dilués dans de l'eau milli-Q) supplémenté le jour même avec un inhibiteur de protéase (1X). Une nouvelle étape de lyse par sonication a ensuite été réalisée sur le lysat (20x0.5s à une amplitude 40) à 4°C. L'extrait a été homogénéisé sur roue à 4°C pendant 1 heure puis centrifugé à 4°C (12000g, 5 minutes) et le surnageant a été prélevé et conservé à -80°C jusqu'au protocole de Western-Blot du A<sub>2</sub>AR.

## **Modèle murin *in vivo*.**

Des souris C57Bl6 ont été achetées chez Janvier (France) et ont été manipulées conformément aux directives de l'Union européenne (2010/63) après approbation du Comité d'éthique animale (APAFIS#20170222104585v4). Des souris à P10 (jour postnatal 10) ou P30 (jour postnatal 30) étaient anesthésiés par une injection intrapéritonéale de kétamine (100mg/kg) et xylazine (10mg/kg) diluées dans du NaCl.

## **Génotypage pour les expériences impliquant la purification des microglies.**

Comme il existe un dimorphisme sexuel dans le développement du cerveau, il était important de distinguer les mâles des femelles. Des échantillons de queue ont été récupérés sur les souriceaux mis à mort à P10 et stockés à -20°C. L'ADN a été extrait avec 100µL de soude (NaOH, 50mM) à 95°C pendant 20 min, et la réaction arrêtée avec 30µL de TrisHCl (1M), et l'échantillon vortexé. L'ADN a été directement utilisé ou conservé à -20°C. Une réaction PCR pour amplifier le gène SRY (primers Forward 5'- GGAGCAGGGCTTAAGTACACAG - 3' ; Reverse 5' - AAAGAAATGGTAAAGACAGTAAGAG-3') a été réalisée sur 3µL de l'ADN extrait, avec 10µL du mix GoTaq Green MasterMix. Ce gène impliqué dans la différenciation des gonades en testicules est porté par le chromosome Y et donc présent seulement chez les mâles. Les 35 cycles du programme étaient définis sur des paramètres classiques, avec une température d'alignement à 55°C. Le produit amplifié était migré sur un gel 2% d'agarose-BET à 135V pendant 40 min.

## **Purification des microglies.**

Après anesthésie, les souris ont été perfusées en intracardiaque avec du tampon phosphate salin (PBS) froid afin de vider le sang des vaisseaux sanguins et particulièrement ceux du cerveau. Le cerveau a été récupéré et rapidement disséqué afin de retirer le striatum et le cervelet (deux régions qui expriment beaucoup le A<sub>2A</sub>R) et ne conserver que le cortex et l'hippocampe. Les cellules ont subi une double dissociation avec le kit Neural Tissue dissociation (P) (Miltenyi Biotec) : une dissociation chimique avec la protéase papaine à 37°C pendant 15 min, combinée à une dissociation mécanique par le passage du tissu à travers des pipettes Pasteur érodées avec un diamètre de plus en plus fin, en présence d'une DNase pour dégrader l'ADN extracellulaire libéré par les cellules lysées. La suspension de cellules a ensuite été filtrée à travers des tamis cellulaires en nylon (maillage 70µm, Fisherbrand). Un gradient de Percoll 75-25%-PBS a permis d'isoler les cellules (neurones, microglies, astrocytes) de la gaine de myéline et des débris cellulaires après une centrifugation de 30 min à 800g à 4°C. Les cellules situées à l'interface du Percoll 25% et 75% ont été récupérées, lavées dans du PBS1X et resuspendues dans une solution composée d'EDTA (2 mM) et 0,5% BSA dans du PBS1X (tampon MACS). Elles ont été incubées pendant 15 minutes avec des anticorps dirigés contre la protéine microgliale CD11b couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec), puis passées à travers une colonne exposée à un fort champ magnétique (Colonnes MS et MACS Separator, Miltenyi Biotec). Après trois lavages au tampon MACS, les cellules retenues grâce aux billes magnétiques ont été récupérées. Le rendement en microglie a été évalué par cytométrie de flux (MACSQuant VYB Miltenyi Biotec), entre des échantillons récupérés après le gradient de Percoll ou après la séparation magnétique, incubés avec un

anticorps anti CD11b-FITC (1:200, Invitrogen) pendant 15 minutes à 4°C puis du DAPI. La purification a été considérée correcte lorsqu'un taux de 90% de microglies était atteint.

### **Expériences de RT-qPCR.**

**Extraction d'ARN et transcription inverse.** Les microglies purifiées ont été centrifugées et le culot repris dans 100µL de tampon de lyse (Ambion), puis vortexées. Le lysat a été conservé à -80°C jusqu'à utilisation. L'ARN total a été extrait avec un kit RNAqueous (Invitrogen RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation, Ambion), à l'aide de colonnes de centrifugation de silice liant l'ARN, élué par réhydratation, puis traité à la DNase afin d'éviter toute contamination des échantillons d'ARN par l'ADN qui pourrait affecter la sensibilité et la spécificité de la RT-qPCR, et conservé à -80°C. La concentration et la pureté des échantillons d'ARN ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop™ 1000 (ThermoFisher). La quantité d'ARN et d'ADN se mesurent à des longueurs d'onde absorbées de 260 nm et 280 nm respectivement, et 230nm pour les molécules organiques. La pureté de l'ARN est ainsi évaluée grâce aux rapports  $DO_{260/280}$  et  $DO_{260/230}$ , la bonne qualité de l'ARN se définit par un rapport  $DO_{260/280}$  supérieur à 1,8. Après dénaturation des structures secondaires des ARNs microgliaux, l'ARN isolé a été converti en ADNc via la reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen). Les réactions ont eu lieu dans un mix de 100ng d'amorces aléatoires et 10nM de dNTP. Afin de vérifier que les produits de qPCR synthétisés par la suite proviennent bien de l'ADNc et non d'une contamination par de l'ADN génomique, des contrôles négatifs ont été effectués en parallèle sans la transcriptase inverse (noRT) pour chaque échantillon. La réaction de transcription inverse a eu lieu à 42°C pendant 50 minutes, et a été arrêtée à 70°C pendant 15 minutes. Après la réaction, la concentration d'ADNc a été ajustée à 10ng/µL avec de l'eau milliQ.

**Test des amorces.** Les amorces de PCR des gènes cibles et de deux gènes de ménage ont été construits via l'outil "Primer-BLAST" du logiciel National Center for Biotechnology Information (NCBI), de façon à ce qu'un intron se trouve entre les deux amorces afin d'éviter l'amplification d'ADN génomique résiduel. Deux couples d'amorces par gène d'intérêt ont été testés dans un premier temps par réaction PCR. Les réactions ont eu lieu dans une solution contenant 10 ng d'ADNc et la DreamTaq (ThermoFisher). Un contrôle sans ajout de produit RT mais avec de l'eau et un autre avec le produit de noRT ont été effectués. Les 40 cycles pour l'amplification ont été définis avec des paramètres classiques de PCR et la température d'alignement réglée à 59°C sur le thermocycleur (Eppendorf). Les produits amplifiés ont ensuite migré sur un gel 1,5% d'agarose à 135V pendant 35 min. Un marqueur de taille 1KB (1kbPlus DNA ladder ThermoFisher) a été utilisé. La linéarité des amorces retenues a ensuite été testée par qPCR à partir d'une gamme d'ADNc de RT de cerveau de souris. Le kit utilisé pour la réaction de qPCR était le Absolute Blue QPCR Mix Sybr Green (ThermoFisher),

contenant l'ADN polymérase Taq, des dNTP (désoxyribonucléotides triphosphate), ainsi qu'une sonde d'ADN fluorescente permettant la détection de l'ADN amplifié. Le même programme que pour la PCR classique (Thermocycler QuantStudio5 ThermoFisher) a été appliqué.

Gène cible	Amorces	Taille produit (pb)
Adora1 (NM_001039510.2)	Sens	5'-CATTGGGCCACAGACCTACT-3'
	Antisens	5'-TGTACCGGAGAGGGATCTTG-3'
Adora2a (NM_009630.3)	Sens	5'-GTGGGAGCCAGAGCAAGAG-3'
	Antisens	5'-CCAGGGAGAGCTTCCCAAAG-3'
Adora3 (NM_009631.4)	Sens	5'-CTGCTGATCTTCACCCATGCT-3'
	Antisens	5'-CAAAGGCCCAAGAATAGCCA-3'
mHprt (NM_013556.2)	Sens	5'-TGCTCGAGATGTCATGAAGG-3'
	Antisens	5'-TATGTCCCCCGTTGACTGAT-3'
Cyp	Sens	5'-CCATCGTGTTCATCAAGGACTT-3'
	Antisens	5'-TTGCCATCCAGCCAGGAGGTC-3'

**qPCR de l'ADNc des microglies purifiées.** Le niveau d'expression des ARNm des gènes d'intérêts a été déterminé grâce à des réactions de qPCR à partir de 40ng de l'ADNc obtenu à partir de l'ARN total des microglies purifiés, en utilisant le même ABsolute Blue QPCR Mix Sybr Green que pour le test de linéarité des amorces. Des réactions dans un volume de 10µL ont été réalisées en triplicat pour chaque échantillon sur des plaques de 384 puits. Le contrôle sans ADNc mais en présence de l'ARN a été effectué pour chaque gène en mixant les réactions de noRT des échantillons utilisés. Une gamme d'ADNc de 16 à 2ng a été réalisée pour chaque gène sur chaque plaque de qPCR en mixant l'ADNc de chaque échantillon utilisé sur la plaque. Tous les échantillons étaient placés dans l'appareil de PCR en temps réel QuantStudio™. Une courbe de fusion à l'issue des 40 cycles permettait de vérifier qu'il y a un produit d'amplification unique dans chaque condition. Les courbes standards et les courbes d'amplifications pour chacun des quatre gènes ont été obtenues grâce au logiciel QuantStudio™.

Les courbes d'amplification permettent de définir un seuil de fluorescence où le signal est supérieur au bruit de fond et est situé dans la phase exponentielle de l'amplification. Il est déterminé par le logiciel de l'appareil (QuantStudio™) en tenant compte des courbes d'amplification de tous les gènes cibles. Les Ct (cycle de seuil) des différents échantillons sont alors déterminés : ils correspondent au nombre de cycles nécessaires pour atteindre ce seuil. Quant à l'efficacité d'amplification (EA), elle est révélée à partir de la pente des courbes standards. Celle-ci est en théorie égale à 100% (doublement du nombre d'amplicons à chaque cycle), mais des EA comprises entre 90% et 110% sont acceptables. Seules les valeurs au

sein d'un triplicat dont le SD des CT n'excédait pas 0.250 ont été conservées pour l'analyse. Enfin, pour l'expression des résultats, la quantité d'ADNc de chaque gène cible est normalisée par rapport à celle de deux gènes de référence (Cyp et mHprt), en utilisant le calcul suivant :  $Q_{\text{gène cible}}/Q_{\text{référence}} = (1+EA)^{\Delta Ct}$  avec  $\Delta Ct = Ct(\text{référence}) - Ct(\text{gène cible})$ .

### **Immunohistochimie et microscopie confocale *in vivo*.**

**Pour l'étude de l'expression du A<sub>2A</sub>R microglial *in vivo***, après anesthésie des souris, une perfusion intracardiaque de PB (0,12M) PFA 4% a été réalisée jusqu'à fixation de l'organisme de l'animal, soit environ 50mL pour une souris à P10 et 100mL pour une souris à P30. Les cerveaux ont ensuite été extraits du crâne et post-fixés dans la même solution pendant une nuit à 4°C. Ils ont été transférés le lendemain dans une solution de PB 30% sucrose (D+saccharose) à 4°C après plusieurs rinçages dans du tampon phosphate (PB). Les cerveaux ont été coupés au cryotome (ThermoFisher) en tranches coronales de 50µm d'épaisseur, récupérées dans du PB, puis stockées à 4°C. Si l'immunohistochimie n'était pas réalisée les jours suivant, les tranches ont été transférées dans une solution d'amaral (composée d'éthylène glycol 30% (Sigma Aldrich), de glycérol 30% (Sigma Aldrich) dans du tampon phosphate 0.12M)) pour être conservées à -20°C. Avant le marquage, les tranches sélectionnées (n=3 par animal) ont été lavées plusieurs fois dans du PB sous agitation. L'incubation dans du citrate de sodium (50 mM, pH 9), pendant 30 minutes à 80°C a permis un démasquage antigénique, puis les tranches ont été à nouveau rincées plusieurs fois dans du PB. Les tranches ont été incubées les anticorps primaires anti-A2A (lapin, 1 :500, Alomone Labs), anti-Iba1 (cochon d'inde, 1 :500, Jackson Immunoresearch) dilués dans du PB avec Triton X-100 0.03% NaN<sub>3</sub> 0.02% pendant 24h à température ambiante puis 4 nuits à 4°C. Après de nouveaux lavages au PB, les coupes ont été incubées dans une solutions d'anticorps secondaires couplés à Cy3 (âne anti-lapin, 1 :500, Jackson Immunoresearch) et Alexa488 (âne anti-cochon d'inde, 1 :500, Jackson Immunoresearch) pendant 48h à 4°C. Les tranches ont été incubées dans une solution de DAPI (1:5000) pendant 20min à température ambiante avant le montage des tranches sur lamelle avec du Mowiol. Les images ont été acquises au microscope confocal (Leica SP5) avec l'objectif 40X en utilisant le logiciel d'imagerie standard de Leica. Des mosaïques au niveau du gyrus denté de l'hippocampe ont été acquises sur 12µm d'épaisseur avec un pas de 0,5µm.

**Pour la quantification de la densité des synapses excitatrices après traitement chronique par SCH-58261 ou caféine pendant la synaptogenèse *in vivo***, des souris sauvage C57bl6 (Janvier) ont reçu des injections intrapéritonéales chroniques de solution saline ou de SCH-58261 (0,1 mg/kg) entre P3 et P16. Les animaux sont restés avec leur mère dans leur cage d'origine entre les injections et ont été collectés pour l'expérimentation à P16. Les souris (P16) ont ensuite été perfusées par voie transcardiaque avec un FSCA glacé

(contenant en mM : NaCl 125, KCl 2,5, CaCl<sub>2</sub> 2,5, MgCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, glucose 25 à pH 7,4 (43), puis post-fixées dans du PFA à 4% à 4°C pendant 75 minutes. Les cerveaux fixés ont été cryoprotégés dans 30 % de saccharose et des coupes parasagittales flottantes ont été réalisées à l'aide d'un cryotome à une épaisseur de 30 µm. Une immunohistochimie a été réalisée sur les sections flottantes. Les coupes ont été rincées et perméabilisées dans du PBS avec 0.2% Triton X-100 à température ambiante, puis rincées 3 fois. Les tranches ont été bloquées avec du l'albumine sérique bovine à 5% (BSA, Euromedex) pendant 1 heure à température ambiante, puis incubées avec les anticorps primaires anti-VGLUT1 (cochon d'inde, 1 :500, Synaptic Systems) dans une solution de BSA à 5% avec du PBS+ 0.2% TritonX-100 pendant 12heures à 4°C. Les coupes ont été rincées 3 fois dans du PBS. Elles ont été incubées dans l'anticorps secondaire Cy3 (chèvre anti-lapin, 1 :500, Jackson Immunoresearch) pendant 5heures à RT, puis rincées 3 fois avec du PBS. Les coupes ont ensuite été incubées avec du DAPI (1 :2000) pendant 20 minutes, rincées à nouveau et montées sur lame. Les images ont été acquises au microscope confocal (Leica SP5) avec l'objectif 63X en utilisant le logiciel d'imagerie standard de Leica. Des mosaïques au niveau de l'hippocampe ont été acquises et les images ont été analysées sur le logiciel IMARIS avec l'outil Spots.

**Pour la quantification de la densité de microglies après traitement chronique par SCH-58261 ou caféine pendant la synaptogenèse *in vivo***, les animaux à P16 ont été perfusés et les coupes flottantes préparées comme indiqué ci-dessus. Les coupes ont été rincées et perméabilisées dans du PBS avec 0.2% Triton X-100 à température ambiante, puis incubées dans du PBS avec 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) pendant 30 minutes, et rincées à nouveau 3 fois dans du PBS avec 0.2% Triton X-100. Les tranches ont été bloquées avec du sérum de chèvre normal à 5% (NGS, Vector) pendant 1 heure à température ambiante, puis incubées avec les anticorps primaires anti-Iba1 (lapin, 1 :1000, Wako) dans une solution de NGS à 5% avec du PBS+ 0.2% TritonX-100 pendant 12heures à 4°C. Les coupes ont été rincées 1 fois dans du PBS+ 0.2% TritonX-100 puis 2 fois dans du PBS. Elles ont été incubées dans l'anticorps secondaire biotinylé (chèvre anti-lapin, 1 :400, Vector) pendant 1heure à RT, puis rincées 3 fois avec du PBS. Les coupes ont ensuite été incubées avec un Kit ABC (Vector) pendant 2 heures, rincées à nouveau et incubées dans du DAB (Sigma). Après 3 courts rinçages dans l'H<sub>2</sub>O, les coupes sont rincées avec du sérum physiologique et montées sur lames. Elles sont déshydratées avec des incubations successives dans de l'éthanol à 30%, 70%, 95%, 100% puis dans du toluène et recouvertes d'une lamelle. Les images ont été acquises sur un microscope confocal Zeiss (LSM710, Axioscan), en lumière transmise avec un objectif 20X et un zoom 1. Les images ont été analysées sur ImageJ avec une macro personnalisée utilisée pour mesurer la surface marquée et l'intensité sur différentes ROIs.



**Pour la quantification de la phagocytose des synapses par les microglies après traitement néonatal chronique par SCH-58261 ou caféine pendant la synaptogenèse *in vivo*,** les animaux à P16 ont été perfusés et les coupes flottantes préparées comme indiqué ci-dessus. Les tranches ont été rincées dans du PBS, puis incubées PBS avec 0.3% TritonX-100 puis 5 minutes dans du PBS + 0.02% Tween (Fisher). Les coupes ont été bloquées dans du PBS + 0.3% TritonX-100 avec du NGS à 3% (Vector) et de l'albumine sérique bovine à 3% (BSA, Euromedex) pendant 1 heure à température ambiante, puis incubées avec les anticorps primaires anti-CD68 (rat, 1 :500, Biorad) dans la solution de blocage pendant 12 heures à 4°C. Les tranches ont été rincées 3 fois dans du PBS, puis incubées dans les anticorps secondaires Alexa488 (chèvre anti-rat, 1 :500, Life Technologies) dilués dans du PBS pendant 2 heures à RT, et rincées 3 fois avec du PBS. Les coupes ont été incubées dans du NGS à 10% dilué dans du PBS+0.2% TritonX-100 pendant 1h à RT, puis dans une solution d'anticorps primaires anti-synaptophysine (Syp, lapin, 1 :250, Abcam) et anti-Homer1 (poulet, 1 :400, Synaptic Systems) dans du PBS+0.2% TritonX-100+5%NGS à 4°C pendant 12h. Les coupes ont ensuite été rincées 3 fois dans du PBS, puis incubées avec les anticorps secondaires Alexa647 (chèvre anti-lapin, 1 :500, Invitrogen) et Alexa594 (âne anti-poulet, 1 :500, Jackson Immunoresearch) dilués dans du PBS pendant 1 heure à RT. Les tranches sont rincées 3 fois et incubées dans du DAPI (1 :5000, ThermoFisher) pendant 5 minutes, et rincées à nouveau 2 fois et 1 autre fois avec du sérum physiologique. Les coupes ont été montées sur lame et traitées avec de l'éthanol à 70%, puis du noir soudan et à nouveau de l'éthanol 70%. Elles ont été rincées avec du sérum physiologique et recouvertes d'une lamelle. Les images ont été acquises sur un microscope confocal Zeiss (LSM710, module AIRYSCAN), avec l'objectif 63X. Les acquisitions ont été analysées sur IMARIS par reconstruction 3D, avec l'outil Surface pour CD68, Spots pour Homer1 et Syp. L'extension IMARIS Spots into Surface a été utilisée pour la colocalisation des marqueurs synaptiques dans les lysosomes microgliaux.

### **Microscopie électronique du A<sub>2A</sub>R *in vivo*.**

**Préparation des tissus.** Trois souris P7 et P30, obtenues à l'animalerie (École de médecine, Université de Castilla-La Mancha), ont été utilisées dans cette étude pour les analyses immunohistochimiques préalables à l'inclusion. Les soins et la manipulation des animaux avant et pendant les procédures expérimentales étaient conformes aux réglementations espagnoles (RD 1201/2005) et de l'Union européenne (86/609/CE), et les protocoles ont été approuvés par le comité de protection et d'utilisation des animaux de l'université. Pour chaque stade de développement, les animaux utilisés provenaient de portées différentes.

Pour l'immunohistochimie, les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de kétamine/xylazine 1:1 (0,1 ml/kg de poids corporel) et perfusés par voie intracardiaque avec un fixateur glacé contenant 4 % de PFA, avec 0,05 % de glutaraldéhyde et 15 % (v/v) d'acide

picrique saturé dans un tampon phosphate 0,1 M (PB, pH 7,4). Après perfusion, les cerveaux ont été retirés et immergés dans le même fixateur pendant 2 heures ou 12 heures à 4°C. Les blocs de tissus ont été lavés soigneusement dans du PB 0,1 M. Des sections coronales de 60 µm d'épaisseur ont été coupées sur un Vibratome (Leica V1000). Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : anti-A2A (cochon d'inde, 3-5 µg / mL, Frontier Institute). Les caractéristiques et la spécificité de l'anticorps ciblant A2A ont été décrites ailleurs (Quiroz et al., 2009). Les anticorps secondaires utilisés étaient des IgG de chèvre anti-cochon d'Inde couplés à de l'or de 1,4 nm (1:100 ; Nanoprobes Inc., Stony Brook, NY, USA).

**Immunohistochimie pour la microscopie électronique.** Les réactions immunohistochimiques pour la microscopie électronique ont été réalisées en utilisant la méthode immunogold de pré-embedding décrite précédemment (Luján et al., 1996). En bref, les sections flottantes ont été incubées dans du NGS dilué dans du TBS à 10 % (v/v). Les sections ont ensuite été incubées dans des anticorps anti-A2A [3-5 µg/mL dilués dans du TBS contenant 1 % (v/v) de NGS], puis dans des IgG de chèvre anti-cochon d'inde couplées à de l'or de 1,4 nm (Nanoprobes Inc., Stony Brook, NY, USA), respectivement. Les sections ont été postfixées dans du glutaraldéhyde à 1 % (v/v) et lavées dans de l'eau bidistillée, puis les particules d'or ont été rehaussées à l'argent avec un kit HQ Silver (Nanoprobes Inc.). Les sections ont ensuite été traitées au tétraoxyde d'osmium (1 % dans un tampon phosphate 0,1 M), colorées en bloc à l'acétate d'uranyle, déshydratées dans des séries graduelles d'éthanol et enrobées à plat sur des lames de verre dans de la résine Durcupan (Fluka). Les régions d'intérêt ont été coupées à 70-90 nm sur un ultramicrotome (Reichert Ultracut E, Leica, Autriche) et recueillies sur des grilles de cuivre recouvertes de pioloforme à fente unique. La coloration a été effectuée sur des gouttes d'acétate d'uranyle aqueux à 1 % suivies de citrate de plomb de Reynolds. Les analyses ultrastructurales ont été réalisées dans un microscope électronique Jeol-1010.

**Quantification de l'immunoréactivité A<sub>2A</sub>R dans les cellules pyramidales CA1.** Pour déterminer l'abondance relative des A<sub>2A</sub>R dans les épines dendritiques des cellules pyramidales CA1, et leur association avec les synapses excitatrices, les immunoparticules identifiées dans chaque zone de référence et présentes dans les épines dendritiques ont été comptées. Comme les différences dans la distribution des immunoparticules entre tous les échantillons n'étaient pas statistiquement significatives ( $P > 0,43$ , test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov), les données ont été regroupées. La longueur de la membrane de l'épine dendritique depuis le bord de la jonction synaptique et la longueur depuis le centre de chaque immunoparticule présente ont ensuite été mesurées le long de la membrane plasmique jusqu'au bord de la densité postsynaptique, à l'aide d'une tablette de numérisation et du logiciel approprié (ImageJ). Enfin, le nombre d'immunoparticules a été exprimé en

fréquence relative dans des segments membranaires de 60 nm de la membrane de l'épine, obtenant ainsi une valeur normalisée de l'abondance relative de A2AR le long des épines dendritiques des cellules pyramidales CA1.

### **Statistiques.**

La sélection de la taille des échantillons adaptée pour les expériences est basée sur des expériences publiées, des études pilotes ou l'expertise interne au laboratoire. Toutes les données ont été utilisées dans les analyses, sauf dans de rares cas explicités. Les cellules montrant des signes de souffrance (présence de blobs, neurites fragmentés) n'ont pas été prises en compte dans les analyses. Pour toutes les quantifications, les valeurs présentées sont des moyennes  $\pm$  s.e.m, et les différences sont significatives pour les p-values inférieures à 0.05 (\* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Pour les données des immunocytochimie et immunohistochimie, de qPCR ainsi que les temps de résidence en SPT, les moyennes ont été comparées soit avec le test non paramétrique de Mann-Whitney (t-test) ou en utilisant une ANOVA non paramétrique Kruskal-Wallis suivie d'un test post hoc Dunnett sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.2). Pour les mesures de coefficients de diffusion ou d'aire explorée et SPT, les valeurs n'ayant pas de distribution normale ont été comparées avec un test non paramétrique de Kolmogorov–Smirnov sur Matlab (The Mathworks, Natick, MA).

### Tableaux récapitulatifs des anticorps utilisés.

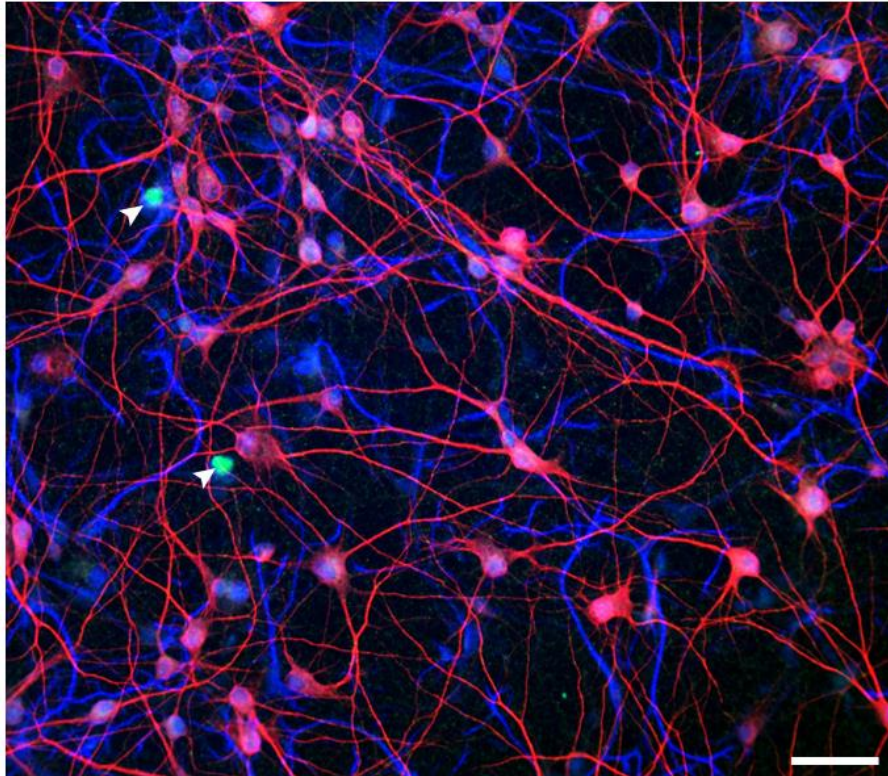
Anticorps primaires	Fournisseur	Référence	Espèce	Concentration utilisée
anti-A2AR	Alomone Labs	AAR-002	Lapin	1 :100
anti-A2AR	Frontiers Institute	AB_2571656	Cochon d'inde	3-5 µg/mL
anti-CD11b-FITC	Invitrogen	AB_464936	Souris	1 :100
anti-CD68	BioRad	MCA1957	Rat	1 :500
anti-C1q	Abcam	ab71940	Souris	1 :1000
anti-GFAP	Synaptic Systems	173 011	Souris	1 :500
anti-GFP	Roche	11 814 460 001	Souris	1 :1000
anti-GluA1	Millipore	PC246	Lapin	1 :200
anti-Homer1	Synaptic Systems	160 006	Poulet	1 :400
anti-Iba1	Jackson Immunoresearch	234 004	Cochon d'inde	1 :500
anti-Iba1	Wako	019-19741	Lapin	1 :750
anti-MAP2	Synaptic Systems	188 004	Cochon d'inde	1 :1000
anti-PSD-95	Invitrogen	MA1045	Souris	1 :175
anti-Syp	Abcam	ab14692	Lapin	1 :250
anti-VGLUT1	Synaptic Systems	135 303	Lapin	1 :500
anti-VGLUT1	Synaptic Systems	135 304	Cochon d'inde	1 :500

<b>Anticorps secondaires</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Référence</b>	<b>Espèce</b>	<b>Concentration utilisée</b>
Fab-non couple (GAR)	Jackson Immunoresearch	711-007-003	Chèvre anti-lapin	1 :400
Fab-biotinylé (GAR)	Jackson Immunoresearch	111-067-003	Chèvre anti-lapin	1 :400
Biotinylé (GAR)	Vector	BA-1000	Chèvre anti-lapin	1 :400
Alexa488 (DAR)	Jackson Immunoresearch	711-545-152	Ane anti-lapin	1 :400
Cy3 (DAR)	Jackson Immunoresearch	711-165-152	Ane anti-lapin	1 :500
FITC (GAR)	Jackson Immunoresearch	111-095-003	Chèvre anti-lapin	1 :400
Fab-Cy3 (GAR)	Jackson Immunoresearch	711-167-003	Chèvre anti-lapin	1 :400
Cy3 (GAR)	Jackson Immunoresearch	111-165-003	Chèvre anti-lapin	1 :300/1 :400
Alexa647 (GAR)	Invitrogen	A21245	Chèvre anti-lapin	1 :500
Alexa405 (GAM)	Jackson Immunoresearch	115-475-003	Chèvre anti-souris	1 :400
Cy3 (GAM)	Jackson Immunoresearch	115-165-206	Chèvre anti-souris	1 :400
Alexa488 (DAGP)	Jackson Immunoresearch	706-545-148	Ane anti-cochon d'inde	1 :400
Cy3 (DAGP)	Jackson Immunoresearch	106-165-003	Ane anti-cochon d'inde	1 :400
Nanogold (GAGP)	Nanoprobes Inc.	2054	Chèvre anti-cochon d'inde	1 :100
Alexa488 (GARat)	Life Technologies	A11006	Chèvre anti-rat	1 :500
Alexa594 (DACH)	Jackson Immunoresearch	703-585-155	Ane anti-poulet	1 :500
Streptavidine-Alexa350	Invitrogen	S-11249	-	1 :400

## RESULTATS

### Présentation du modèle *in vitro*

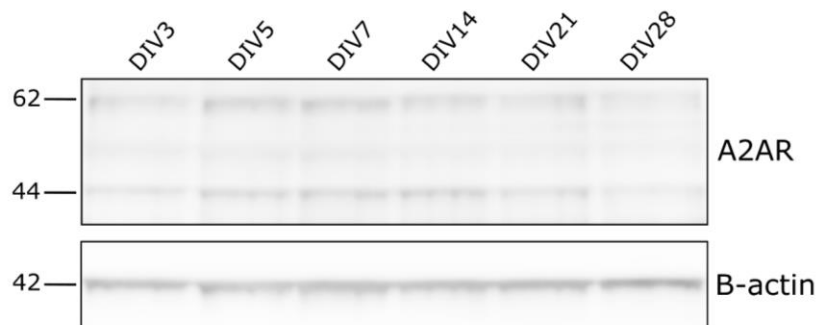
L'étude des mécanismes de stabilisation ou élimination des synapses a été menée sur un modèle biologique de circuit neuronal *in vitro*. Il s'agit de cultures de neurones hippocampiques de rat, contenant des neurones, des astrocytes et des microglies (Figure 1).



**Figure 1 : Les cultures de neurones hippocampiques de rat sont composées de neurones et de cellules gliales.** Image représentative des marquages de MAP2 (rouge), GFAP (bleu) et Iba1 (vert) dans des cultures mixtes neurones+astrocytes+microglie à DIV (day in vitro) 8. Barre d'échelle : 20µm.

## Objectif 1. Expression du récepteur A<sub>2A</sub> au cours du temps aux synapses glutamatergiques et dans les cellules gliales *in vitro* et *in vivo*

Pour étudier l'expression du A<sub>2A</sub>R au cours de la synaptogenèse dans des cultures mixtes neurones-glie hippocampiques de rat, je me suis intéressée à l'expression du A<sub>2A</sub>R par des approches biochimiques. Après extraction des protéines dans des cultures à DIV 3, 5, 7, 14, 21 ou 28, des expériences de Western-blot ont montré un pic d'expression du A<sub>2A</sub>R dans la culture à DIV7 (Figure 2).



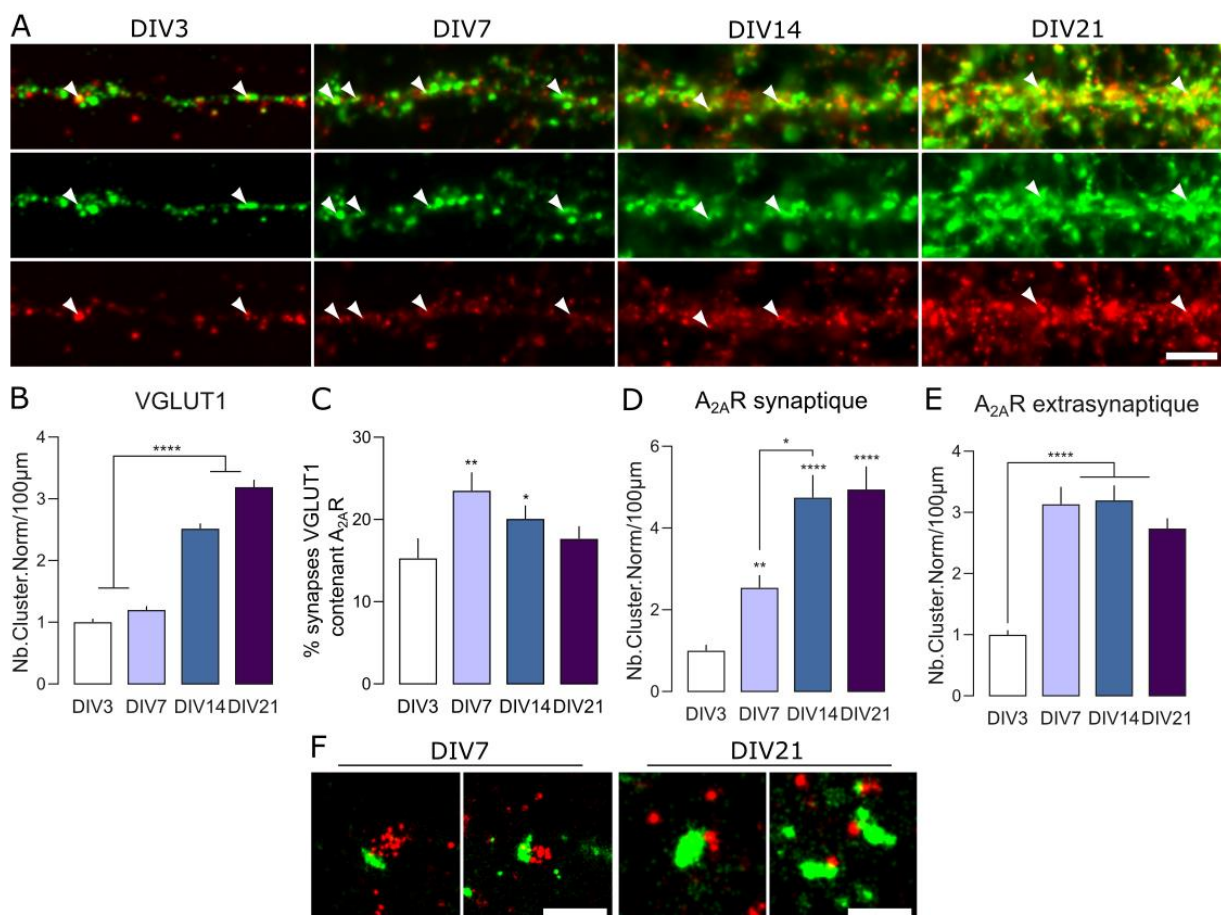
**Figure 2 : Expression du A<sub>2A</sub>R dans les cultures de neurones hippocampiques de rat.** Exemple de western-blot du A<sub>2A</sub>R après extraction des protéines entre DIV3 et DIV28.

Pour déterminer dans quel type cellulaire le A<sub>2A</sub>R est exprimé, j'ai quantifié à différents temps, grâce à des immunomarquages, l'expression du A<sub>2A</sub>R aux synapses glutamatergiques, dans les astrocytes ainsi que dans les microglies (Figures 3-7).

En marquant par immunocytochimie le A<sub>2A</sub>R et le compartiment présynaptique des synapses glutamatergiques VGLUT1, j'ai déterminé l'expression et la localisation du A<sub>2A</sub>R dans les neurones et en particulier aux synapses excitatrices glutamatergiques au cours de la synaptogenèse, en collaboration avec Chloé Masson. J'ai observé que le A<sub>2A</sub>R n'était pas distribué de manière diffuse à la surface des neurones mais qu'il formait des agrégats dont certains colocalisaient avec les agrégats présynaptiques de VGLUT1 et ceci quel que soit le stade étudié (Figure 3A). Le nombre d'agrégats de A<sub>2A</sub>R était faible à DIV3 puis augmentait ensuite entre DIV7 et DIV21 (Figure 3A). Le nombre d'agrégats de VGLUT1 augmentait en parallèle entre DIV3 et DIV21 (Figure 3A). J'ai ensuite quantifié ces observations. Les quantifications ont révélé que le **nombre de synapses glutamatergiques enrichies en A<sub>2A</sub>R atteignait un pic entre DIV7 et DIV14** (Figure 3C), c'est-à-dire pendant la période la plus active de la synaptogenèse, caractérisée par la hausse importante du nombre de boutons VGLUT1 qui atteignait son maximum à DIV14 (Figure 3B) (Dailey and Smith, 1996). A ce stade, j'ai observé que toutes les synapses glutamatergiques n'exprimaient pas le A<sub>2A</sub>R. Ainsi, le A<sub>2A</sub>R était détecté à 23,5 % des synapses glutamatergiques des neurones hippocampiques à DIV7, ce qui suggère un rôle de ce récepteur à une sous-population de synapses. Les

agrégats synaptiques de  $A_{2A}R$  augmentaient de manière significative entre DIV7 et DIV 14 pour atteindre ensuite un plateau (Figure 3D). Le  $A_{2A}R$  était aussi retrouvé à distance des synapses glutamatergiques (Figure 3E). Le nombre d'agrégats de  $A_{2A}R$  non accumulés aux synapses glutamatergiques augmentait fortement entre DIV3 et DIV7 puis ce nombre était maintenu à un niveau stable aux stades plus tardifs (Figure 3E). Ces données permettent de suggérer un rôle du  $A_{2A}R$  à une sous-population de synapses glutamatergiques pendant le pic de formation des synapses glutamatergiques dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe.

J'ai ensuite étudié en microscopie à super-résolution PALM/STORM la localisation subsynaptique du récepteur A2A en marquant le compartiment post-synaptique avec PSD95-mEOS (PALM) et le  $A_{2A}R$  (STORM) au cours de la synaptogenèse (DIV7) ou à un stade plus tardif (DIV21). L'observation d'un certain nombre de synapses suggère un **enrichissement à DIV7 du  $A_{2A}R$  autour de la PSD par rapport à DIV21 (Figure 3F)**, sans savoir si cette localisation est pré- ou post- synaptique.

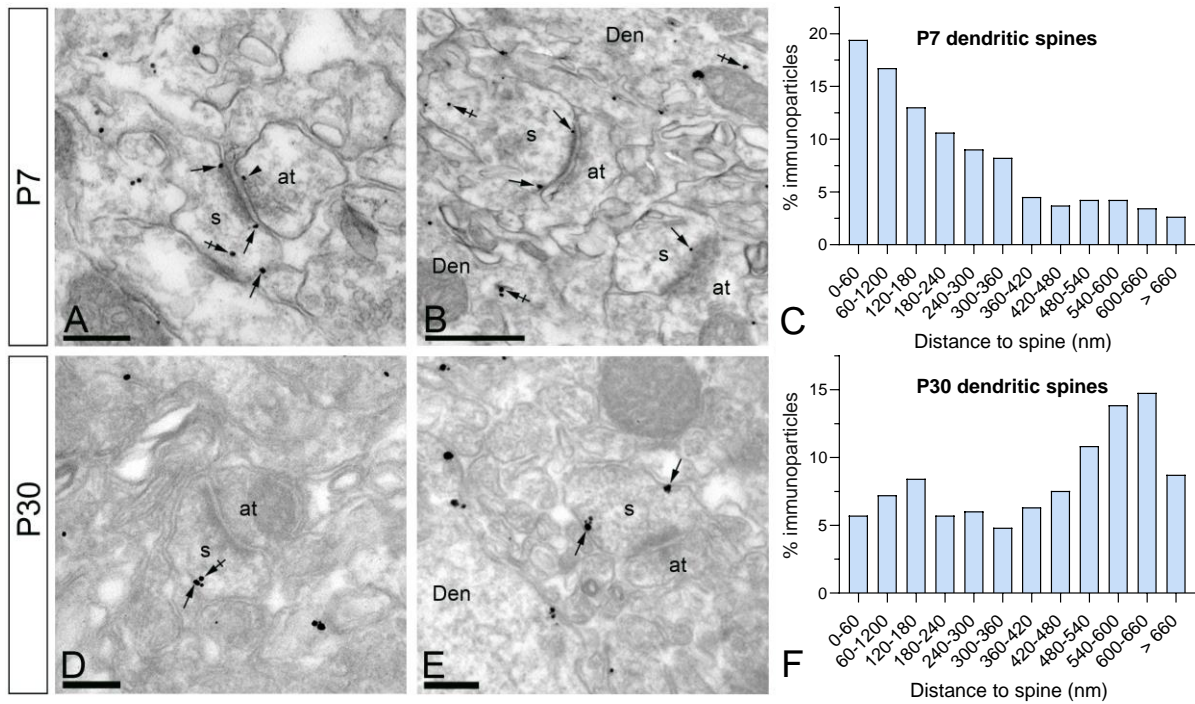


**Figure 3 : Expression du  $A_{2A}R$  aux synapses glutamatergiques.** A. Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et  $A_{2A}R$  (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV3, 7, 14 ou 21. Barre d'échelle : 5µm. Les flèches montrent des exemples de synapses excitatrices co-marquées avec VGLUT1 et  $A_{2A}R$ .



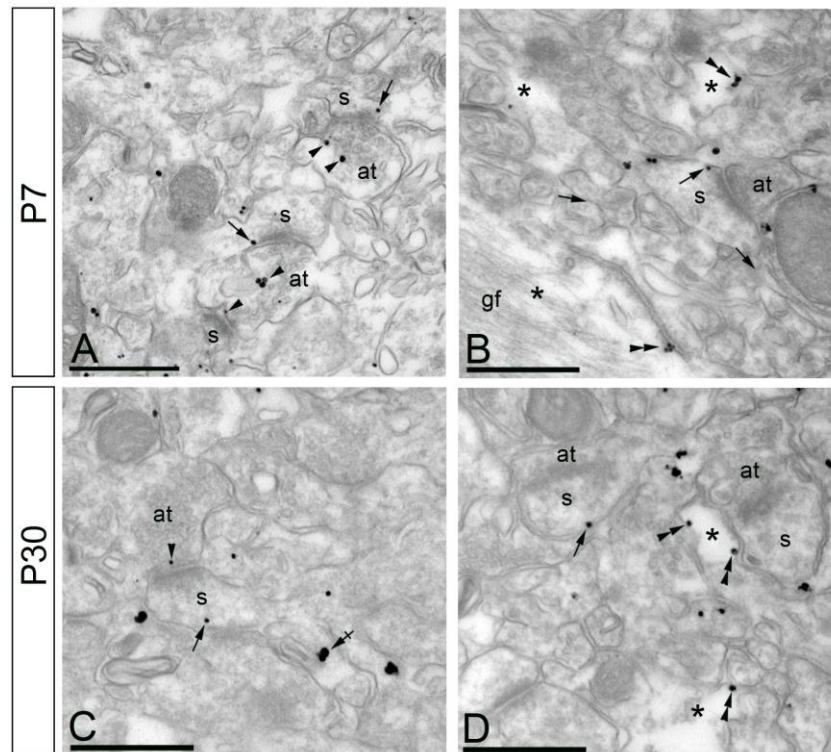
(B-E) Quantifications du nombre de boutons synaptiques glutamatergiques (VGLUT1) (B), pourcentage de synapses co-marquées avec VGLUT1 et A2AR (C), nombre d'agrégats de A2AR colocalisés (D) ou non (E) à la synapse dans les neurones à DIV3, 7, 14 et 21. **Le nombre de synapses marquées par VGLUT1 augmente entre DIV7 et DIV14**, ce qui correspond à la période de synaptogenèse. Notez qu'il y a **plus de synapses glutamatergiques exprimant le A2AR à DIV7** (25%), et que l'expression du récepteur augmente de façon globale dans les cultures au cours de leur maturation. N=45 cellules, 3 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs à DIV3 ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis : \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (F) Images représentatives en super-résolution des détections du A2AR (STORM, rouge) et PSD-95 (PALM, vert) à DIV7 ou DIV21. Notez qu'il y a plus d'agrégats de A2AR autour des clusters de PSD-95 à DIV7 qu'à DIV21. Barre d'échelle : 1 $\mu$ m.

En collaboration avec Rafael Lujan (Espagne), une analyse ultrastructurale du A<sub>2A</sub>R a permis de **préciser la localisation subcellulaire du récepteur A2A** au niveau des synapses excitatrices et des cellules non-neuronales. Cette analyse a montré que le A<sub>2A</sub>R est localisé dans la région pérисynaptique à P10, pendant la période de synaptogenèse, et au niveau des épines dendritiques postsynaptiques à P30 (Figure 4). La localisation postsynaptique du récepteur A2A au stade adulte peut être associée à des régulations plastiques de la synapse impliquant des voies de signalisations AC/AMPC/PKA (voir la partie 2.2.1.2) tandis que sa localisation pérисynaptique suggère une fonction particulière du récepteur au cours de la période de synaptogenèse, comme il a été montré pour la stabilisation des synapses GABAergiques de l'hippocampe (Gomez-Castro et al., 2021).



**Figure 4. Localisation subcellulaire du récepteur A2A dans l'hippocampe au cours du développement postnatal.** Micrographies électroniques du stratum radiatum dans la région CA1 de l'hippocampe montrant des immunoparticules d'A2AR dans les épines dendritiques des neurones pyramidaux, détectées par une méthode d'incorporation présynaptique immunogold (*pre-embedding immunogold*). (A-B) à P7, les immunoparticules de A2AR ont été observées au niveau de la membrane plasmique postsynaptique (flèches) sur les dendrites des neurones pyramidaux (Den) contactées par des terminaisons axonales excitatrices (at), et au niveau de sites intracellulaires. (C) Histogramme représentant la distribution des A2AR immunomarqués *en lien avec* les sites de libération de glutamate dans les épines des neurones pyramidaux à P7. Les données montrées sont la proportion des immunoparticules de A2AR à une distance donnée du bord de la densité postsynaptique. **Environ 68.9% des A2ARs immunomarqués sont situés à 60-300nm de distance, et la densité diminue ensuite fortement plus loin dans la membrane dendritique.** (D-E) à P30, les immunoparticules de A2AR ont été observées au niveau de la membrane plasmique postsynaptique (flèches) sur les dendrites des neurones pyramidaux (Den) contactées par des terminaisons axonales excitatrices (at), et au niveau de sites intracellulaires, mais elles ont été observées plus fréquemment sur la bordure des densités postsynaptiques. (F) Histogramme représentant la distribution des A2AR immunomarqués *en lien avec* les sites de libération de glutamate dans les épines des neurones pyramidaux à P30. Les données montrées sont la proportion des immunoparticules de A2AR à une distance donnée du bord de la densité postsynaptique. **Environ 33.1% des A2ARs immunomarqués sont situés à 60-300nm de distance, et la densité augmente ensuite fortement plus loin dans la membrane dendritique.** Barres d'échelle : A,D,E, 200 nm; B, 500 nm.

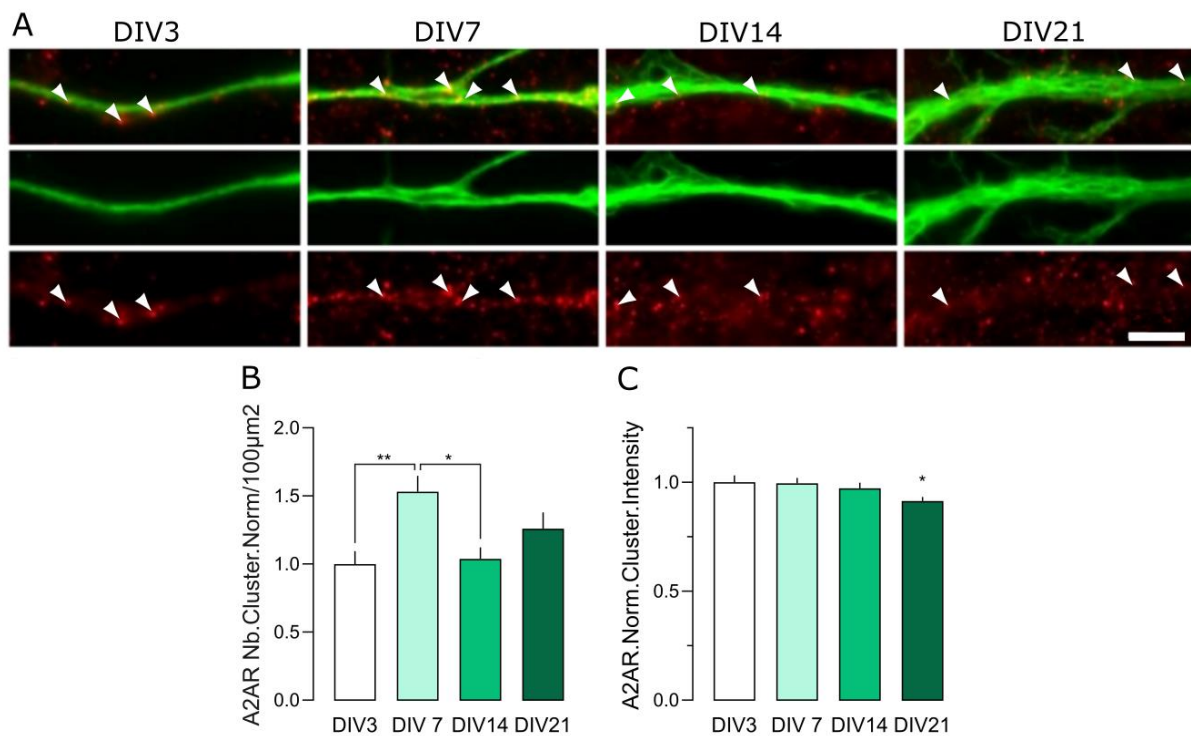
Les résultats de cette analyse ultrastructurale du A<sub>2A</sub>R ont aussi montré de manière intéressante **qu'en plus de la région pérисynaptique, les A<sub>2A</sub>Rs sont présents au niveau des terminaisons axonales présynaptiques dans la région CA1 de l'hippocampe, mais aussi au niveau de la membrane des astrocytes** (Figure 5). La localisation présynaptique du récepteur A2A au stade adulte (P30, Figure 5C, 5D) peut correspondre à son rôle dans la régulation de la libération de neurotransmetteur (voir la partie 2.2.1.1). Les localisations subcellulaires du A<sub>2A</sub>R au cours du développement (P7, Figure 5A, 5B) suggèrent une implication du récepteur dans les cellules neuronales et non-neuronales.



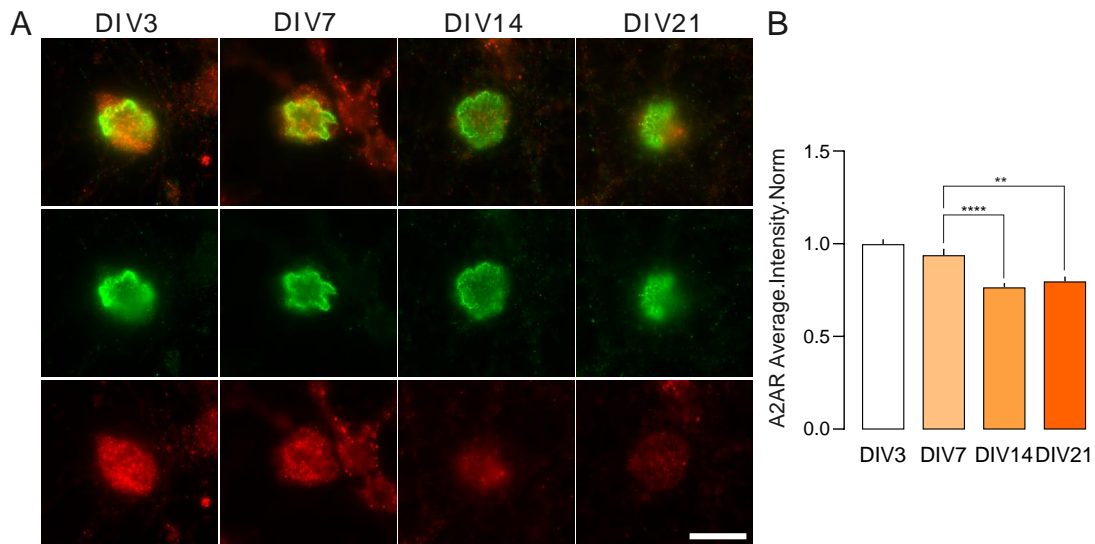
**Figure 5 : Localisation subcellulaire du récepteur A2A dans l'hippocampe au niveau des sites présynaptiques et des astrocytes au cours du développement postnatal.** Micrographies électroniques du stratum radiatum dans la région CA1 de l'hippocampe, détectées par une méthode d'incorporation présynaptique immunogold (pre-embedding immunogold). (A-D) à P7 ou P30, les immunoparticules de A2AR ont été observées au niveau de la membrane plasmique présynaptique (flèches) sur les terminaisons axonales excitatrices (at) contactant les épines dendritiques (s) des neurones pyramidaux de CA1. Les immunoparticules de A2AR ont aussi été observées le long de la membrane plasmique (flèches doubles) des **astrocytes** (astérisques), parfois reconnus par des faisceaux de gliofilaments (gl). Barres d'échelle : A-D, 500 nm.

**Pour déterminer l'expression et la localisation du A<sub>2A</sub>R dans les astrocytes** (Figure 6) **et les microglies** (Figure 7) au cours de la synaptogenèse dans le modèle de neurones hippocampiques *in vitro*, j'ai marqué le A<sub>2A</sub>R par immunocytochimie dans les cellules GFAP- ou Iba1-positives. J'ai observé que le A<sub>2A</sub>R formait des agrégats à la surface des astrocytes immunoréactifs pour la GFAP (Figure 6A). J'ai observé un **pic d'expression du A<sub>2A</sub>R à DIV7 dans les prolongements astrocytaires**, tandis que l'intensité des agrégats n'était pas modifiée au cours de la maturation de la culture (Figure 6B-C).

Le A<sub>2A</sub>R était diffus à la surface des microglies (Figure 7A). De plus, l'intensité de fluorescence du A<sub>2A</sub>R diminue après DIV7 dans les microglies (Figure 7A-B). **L'ensemble de ces résultats suggère un rôle particulier des A<sub>2A</sub>R neuronaux, astrocytaires et/ou microgliaux au cours de la synaptogenèse *in vitro*.**



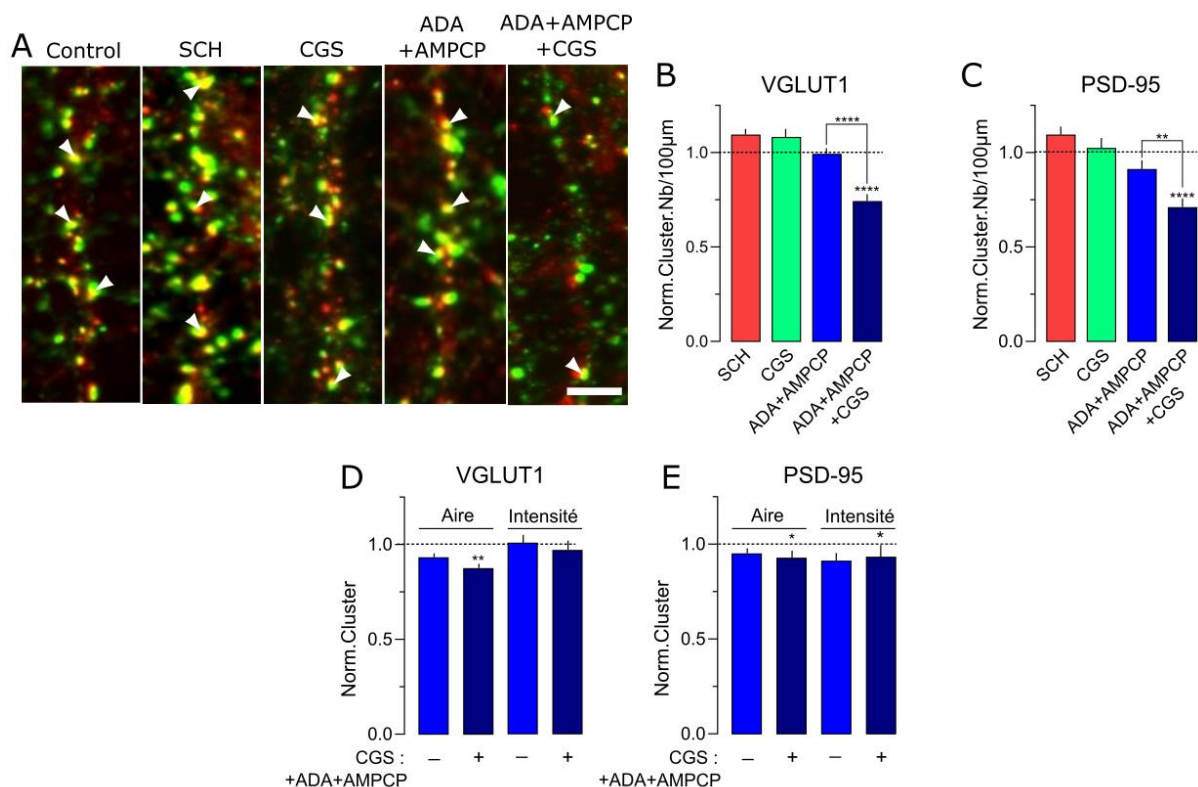
**Figure 6 : Expression du A<sub>2A</sub>R dans les prolongements astrocytaires.** A. Images représentatives des marquages GFAP (vert) et A<sub>2A</sub>R (rouge) dans des cultures hippocampiques à DIV3, 7, 14 ou 21. Barre d'échelle : 5µm. Les flèches montrent des clusters de A<sub>2A</sub>R au sein des astrocytes. B. Quantifications du nombre d'agrégats de A<sub>2A</sub>R dans les prolongements astrocytaires marqués par la GFAP. Le nombre d'agrégats de A<sub>2A</sub>R dans ce type cellulaire augmente à DIV7, au pic de synaptogenèse. N=45 cellules, 3 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs à DIV3 ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis : \*p<0.05; \*\*p<0.01.



**Figure 7 : Expression du A<sub>2A</sub>R dans la microglie.** A. Images représentatives des marquages Iba1 (vert) et A<sub>2A</sub>R (rouge) dans des cultures hippocampiques à DIV3, 7, 14 ou 21. Barre d'échelle : 10µm. B. Quantifications de l'intensité moyenne de A<sub>2A</sub>R dans les cellules microgliales marquées par Iba1. L'intensité du marquage A<sub>2A</sub>R est plus élevée aux stades précoces dans la culture, puis elle diminue à partir de DIV14. N=50 cellules, 3 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs à DIV3 ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis, test post-hoc Dunn : \*p<0.05; \*\*p<0.01.

**Objectif 2 : Caractérisation des effets médiés par les récepteurs adénoenergiques A1 et A2A sur la synaptogenèse glutamatergique et spécificité des effets médiés par les récepteurs A2A.**

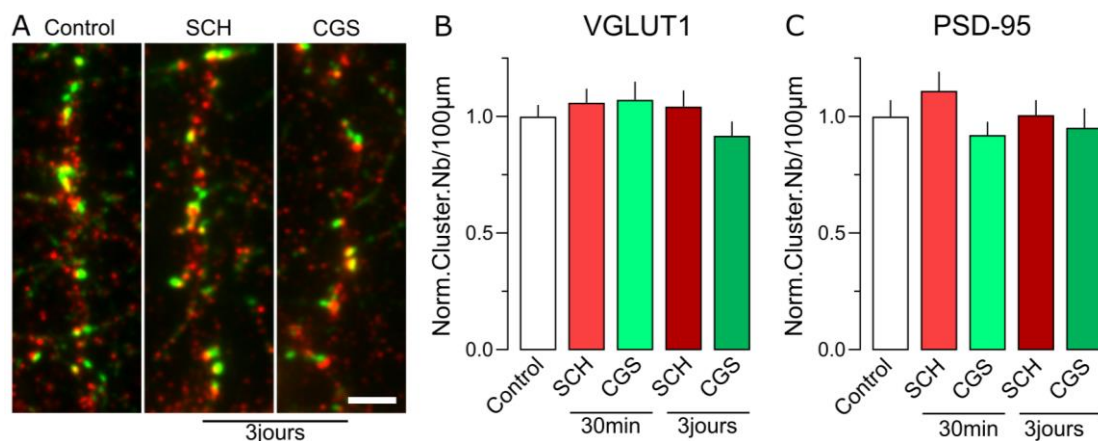
Pour étudier la contribution du A<sub>2A</sub>R à la synapse glutamatergique, j'ai utilisé une approche pharmacologique, avec un antagoniste et un agoniste sélectifs du récepteur, respectivement le SCH-58261 (SCH, 100nM) et le CGS-21680 (CGS, 30nM), et observé les effets de ces drogues sur les synapses glutamatergiques *in vitro*. Dans des cultures mixtes à DIV8, j'ai marqué par immunocytochimie les compartiments pré- et post-synaptiques de la synapse excitatrice (avec les marqueurs VGLUT1 et PSD-95) sur les dendrites (Figure 8A). J'ai quantifié le **nombre de synapses glutamatergiques VGLUT1-positives** (Figure 8B) et j'ai analysé la PSD-95 aux synapses glutamatergiques qui persistaient en quantifiant les agrégats de **PSD-95 colocalisés avec les agrégats de VGLUT1** (en jaune, Figure 8A indiqués par des flèches). J'ai observé que 30 minutes de traitement avec l'antagoniste ou l'agoniste du A<sub>2A</sub>R n'impacte pas la densité de synapses glutamatergiques (Figure 8B) ni la PSD-95 aux synapses glutamatergiques (Figure 8C). L'exposition au SCH induit une augmentation de 9% des boutons VGLUT1 ou PSD-95 aux synapses, mais cette légère augmentation n'est pas significative (Figure 8B, C).



**Figure 8. La régulation de la densité des synapses glutamatergiques est médiée par le A<sub>2A</sub>R au cours de la synaptogenèse *in vitro*.** (A) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV8 exposés ou non pendant 30 minutes au SCH-58261 (SCH, 100nM), CGS-21260 (CGS, 30nM), adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et

l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 5 $\mu$ m. Les flèches montrent des exemples de synapses excitatrices glutamatergiques **co-marquées avec VGLUT1 et PSD-95**. (B-E) Quantifications du nombre, de l'aire et de l'intensité des **clusters présynaptiques VGLUT1 (B, D), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C, E)** dans des neurones à DIV8 prétraités avec les drogues indiquées pendant 30 minutes. Le blocage des  $A_{2A}R$ s avec le SCH a tendance à renforcer la partie postsynaptique des synapses, tandis que l'activation des  $A_{2A}R$ s avec du CGS en absence d'adénosine ambiante induit une perte des synapses glutamatergiques. N=121-129 cellules, 7-8 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis et post-hoc Dunn : \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Cette absence d'effet de l'antagoniste n'était pas due à une faible concentration ni à un court temps d'incubation de la drogue car des neurones exposés à 500nM de SCH (non montré) ou à 100nM pendant 3 jours ne montrait pas non plus de changement significatif du nombre de synapses glutamatergiques (Figure 9 A-C).

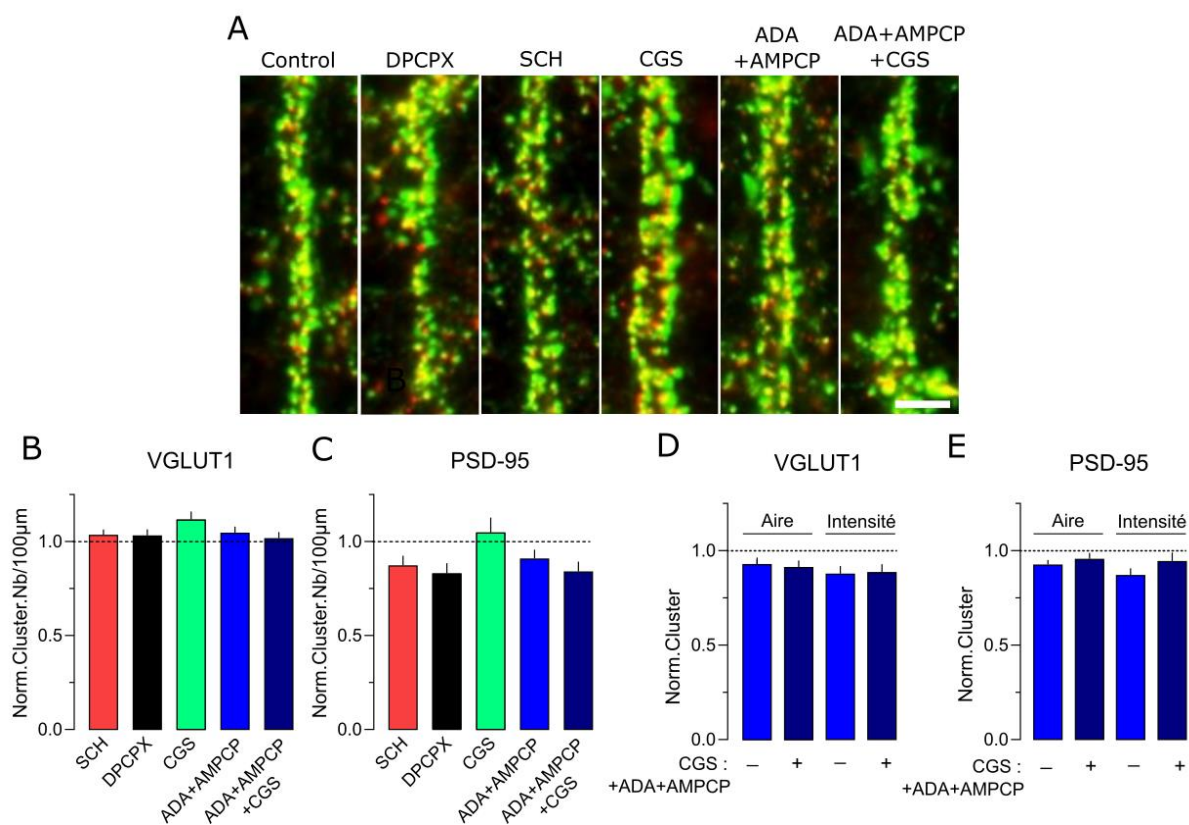


**Figure 9. Absence d'effet d'un blocage ou d'une activation sur le long terme du  $A_{2A}R$  sur la densité de synapses glutamatergiques.** (A) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV8 exposés ou non pendant 30 minutes ou 3 jours au SCH-58261 (SCH, 100nM), CGS-21260 (CGS, 30nM). Barre d'échelle : 5 $\mu$ m. (B-C) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (B), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C) dans des neurones à DIV8 prétraités avec les traitements indiqués pendant 30 minutes ou 3 jours. Le blocage aigu des  $A_{2A}R$ s avec le SCH a tendance à renforcer la partie postsynaptique des synapses, mais il n'y a pas d'effet du blocage des  $A_{2A}R$ s pendant 3 jours sur la densité des synapses. N= 30-33 cellules, 2 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis.

Cependant, réduire l'adénosine ambiante en ajoutant de l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) qui transforme l'adénosine en inosine, et de l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (AMPCP, 85nM), qui inhibe l'ecto-nucléotidase CD73 (voir partie 2.1.1.), permet de mettre en évidence les effets d'une activation directe du  $A_{2A}R$  par le CGS. Dans ces conditions d'activation du récepteur, j'ai observé une **perte significative de plus de 25% d'agrégats de VGLUT1** et de près de 20% de PSD-95 aux synapses qui persistent (Figure 8B, C) par rapport à la condition en niveau d'adénosine réduit (ADA+AMPCP). L'activation du  $A_{2A}R$  avec le CGS en absence d'adénosine ambiante diminuait de 6% l'aire des agrégats de VGLUT1 (Figure 8D) et de 3% celle des PSD-95 postsynaptiques (Figure 8E) ainsi que l'intensité des agrégats de PSD-95 mais pas de VGLUT1 (Figure 8D, E) par rapport au contrôle mais pas par rapport à la condition ADA+AMPCP. Ces résultats indiquent que l'activation des  $A_{2A}Rs$ , en absence d'adénosine extracellulaire, induit un **démantèlement d'une population de synapses glutamatergiques et une réorganisation des synapses persistantes qui se caractérise par une perte en PSD-95 (Figure 8)**. Le fait qu'une modulation rapide (en 30 minutes) de la signalisation adénosinergique affecte la densité de synapses indique un **rôle du  $A_{2A}R$  dans la stabilisation des synapses plutôt que dans la formation *de novo* de synapses, un processus qui prend entre 3 et 4 heures** (Dobie and Craig, 2011).

De manière intéressante, **ces effets sont restreints à la période de synaptogenèse**. En effet, j'ai également effectué les traitements pharmacologiques décrits ci-dessus dans des cultures mixtes à un stade mature (DIV21). Je n'ai pas observé de différences significatives entre les nombres, aires ou intensités des clusters pré- et postsynaptiques après 30 minutes de traitement, ce qui montre que **les effets observés sont transitoires et propres à la période de synaptogenèse (Figure 10)**.



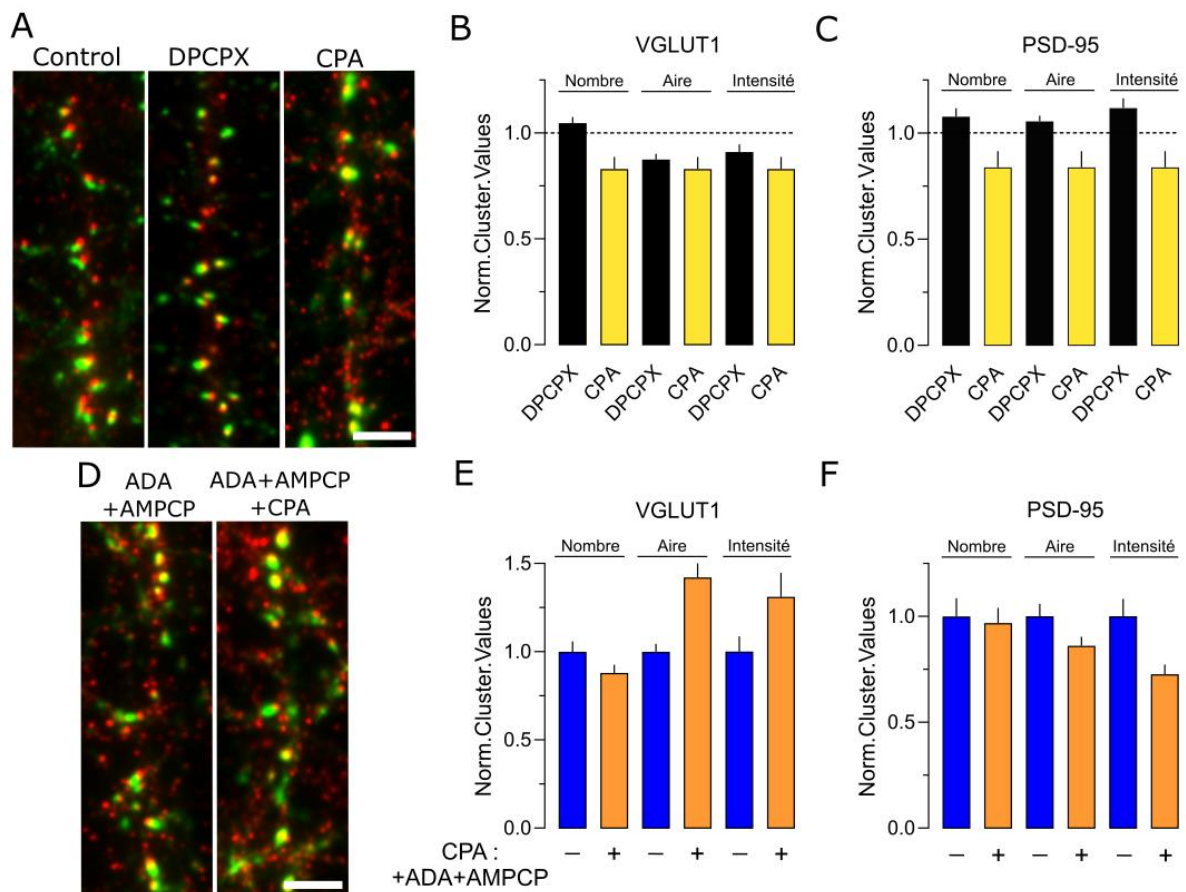


**Figure 10 : La régulation des synapses médiée par les A<sub>2A</sub>Rs est restreinte à la période de synaptogenèse *in vitro*.** (A) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV21 exposés ou non pendant 30 minutes au DPCPX (100nM), au SCH-58261 (SCH, 100nM), CGS-21260 (CGS, 30nM), adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -méthylène) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 5µm. (B-E) Quantifications du nombre, de l'aire et de l'intensité des clusters présynaptiques VGLUT1 (B, D), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C, E) dans des neurones à DIV21 prétraités avec les drogues indiquées pendant 30 minutes. **Notez l'absence d'effets du traitement ADA+AMPCP+CGS sur le nombre de synapses à DIV21 par rapport à DIV8** (Figure 6). N= 38-53 cellules, 3-4 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis et post-hoc Dunn : non significatif.

Les effets pharmacologiques observés sur les synapses glutamatergiques dans les cultures de neurones mixtes sont spécifiques des A<sub>2A</sub>Rs. Pour étudier la contribution du A<sub>1</sub>R à la synapse glutamatergique, j'ai utilisé un antagoniste et un agoniste spécifiques du récepteur, respectivement le DPCPX (100nM) et le CPA (10nM). J'ai observé que 30 minutes de traitement avec l'agoniste ou l'antagoniste du A<sub>1</sub>R n'impacte pas significativement la densité de terminaisons synaptiques marquées pour VGLUT1 ni la densité des agrégats postsynaptiques de PSD-95 à DIV8 (Figure 11A-C) ou à DIV21 (Figure 10B, C).

. J'ai cependant observé que l'agoniste avait tendance à diminuer l'aire et l'intensité des agrégats de PSD-95 (Figure 11C).

En absence d'adénosine ambiante (en présence d'ADA et d'AMPCP), l'activation directe du A<sub>1</sub>R par le CPA ne produit pas d'effets significatifs sur la densité de synapses glutamatergiques (Figure 11D-E). Cependant, l'activation du A<sub>1</sub>R avec le CPA n'était pas sans effet puisqu'il augmentait l'aire et l'intensité des agrégats de VGLUT1 tout en diminuant l'aire et l'intensité des agrégats de PSD-95 (Figure 11D-E). **Ces effets d'une activation du A<sub>1</sub>R sur la morphologie des synapses indiquent que les drogues sont actives. D'autre part, l'activation du A<sub>1</sub>R présynaptique est connu pour diminuer la libération vésiculaire en neurotransmetteur. Ainsi, les effets observés seraient dus à un effet indirect du traitement sur l'activité synaptique et la régulation plastique activité-dépendant de la synapse.**

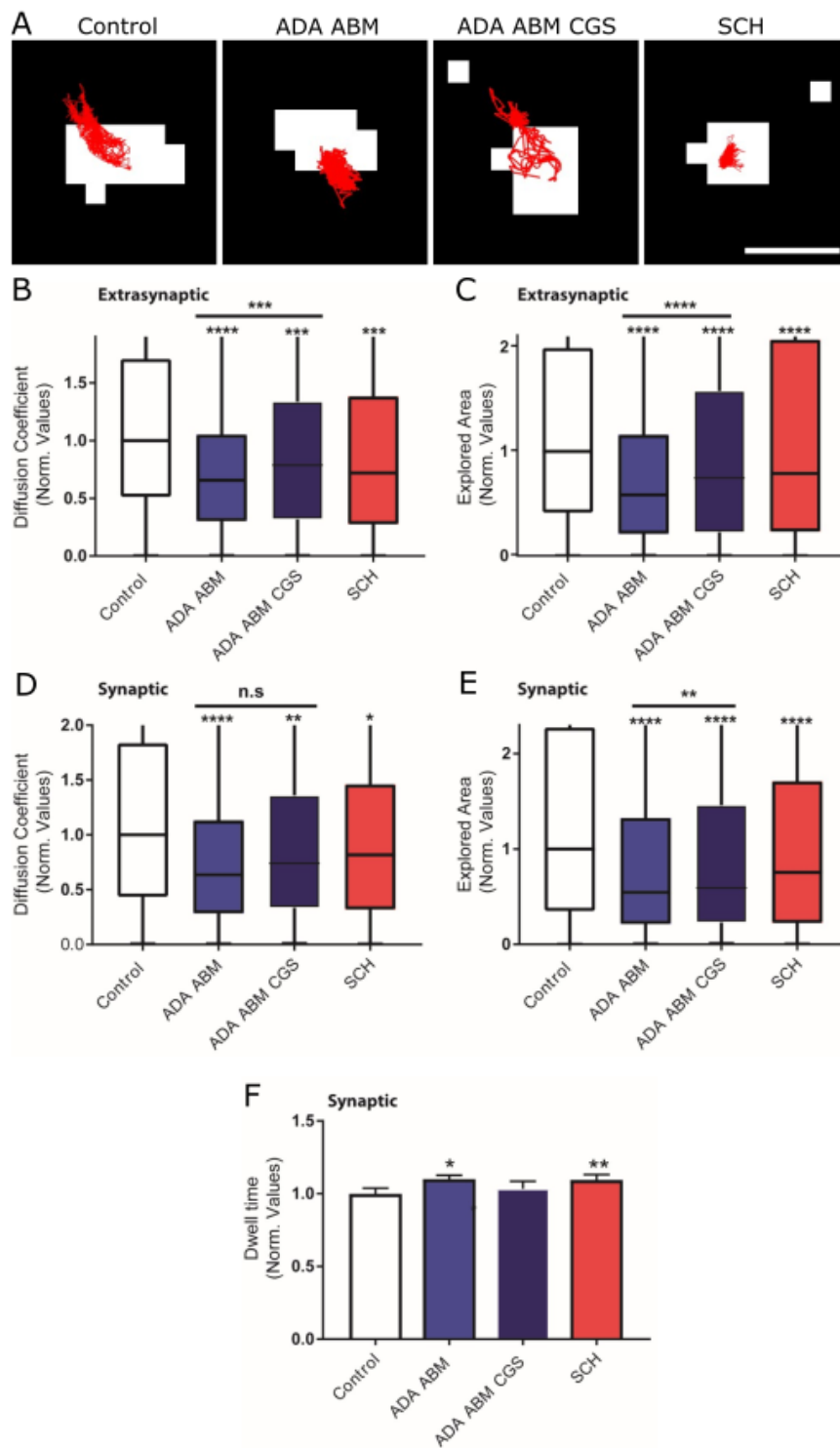


**Figure 11. Les récepteurs A<sub>1</sub> ne régulent pas les synapses glutamatergiques au cours de la synaptogenèse *in vitro*.** (A, D) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV8 exposés ou non pendant 30 minutes au DPCPX (100 nM), au CPA (10nM) (A) ou à l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CPA (ADA+AMPCP+CPA) (D). Barres d'échelle : 5 $\mu$ m. (B-C, E-F) Quantifications du nombre, de l'aire et de l'intensité des clusters

présynaptiques VGLUT1 (B, E), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C, F) dans des neurones à DIV8 prétraités avec les drogues indiquées pendant 30 minutes. Le blocage ou l'activation des A<sub>1</sub>Rs, en présence ou absence d'adénosine ambiante, n'affecte pas le nombre de synapses glutamatergiques. N(DPCPX)= 125-129 cellules, 8 cultures ; N(CPA)= 20-23 cellules, 2 cultures, N(ADA+AMPCP)= 28 cellules, 2 cultures. Dans les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ou ADA+AMPCP ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis et post-hoc Dunn.

Ces résultats permettent de conclure que **le A<sub>2A</sub>R mais pas le A<sub>1</sub>R joue un rôle clef dans le contrôle du nombre de synapses glutamatergiques au cours de la synaptogenèse *in vitro*.**

Après avoir étudié les marqueurs pré- et postsynaptiques VGLUT1 et PSD-95 en réponse à des changements d'activité des A<sub>2A</sub>R, je me suis ensuite intéressée à l'effet de ces drogues sur la **dynamique des récepteurs glutamatergiques** aux synapses, en particulier pour la sous-unité GluA1 du récepteur AMPA (Dias et al., 2012; Kamimura and Maeda, 2021). En suivi de molécule unique (ou SPT pour Single-Particle Tracking) (voir Méthodes), j'ai utilisé les traitements pharmacologiques précédemment décrits, i.e. ADA, AMPCP, CGS ou SCH sur des neurones vivants préalablement transfectés avec un marqueur présynaptique excitateur Homer1-DsRed, et ai imagé les dynamiques de GluA1 aux synapses. Réduire les concentrations d'adénosine extracellulaire en présence d'ADA+AMPCP ou bloquer le A<sub>2A</sub>R dans la culture mixte avec l'antagoniste sélectif SCH, réduit significativement la mobilité des sous-unités GluA1 des récepteurs AMPA, qui sont confinées aux synapses (Figure 12A). En effet, le coefficient de diffusion des GluA1 (Figure 12 B, D) ainsi que l'aire explorée par les récepteurs (Figure 12C, E) diminuent par rapport au contrôle, dans l'espace synaptique et extrasynaptique. Le temps passé à la synapse augmente significativement après ces traitements (Figure 12F), ce qui suggère une capture plus importante de GluA1 aux synapses en conditions de blocage de l'activité du A<sub>2A</sub>R. A l'inverse, activer le A<sub>2A</sub>R avec l'agoniste sélectif CGS dans les cultures en l'absence d'adénosine extracellulaire (ADA+AMPCP+CGS) augmente la diffusion latérale de GluA1. Dans ces conditions, le coefficient de diffusion de GluA1 (Figure 12 B, D) ainsi que l'aire explorée (Figure 12 C, E) augmentent par rapport à ADA+AMPCP, dans l'espace synaptique et extrasynaptique. Le temps passé à la synapse n'est pas modifié par rapport à la situation ADA+AMPCP (Figure 12F).

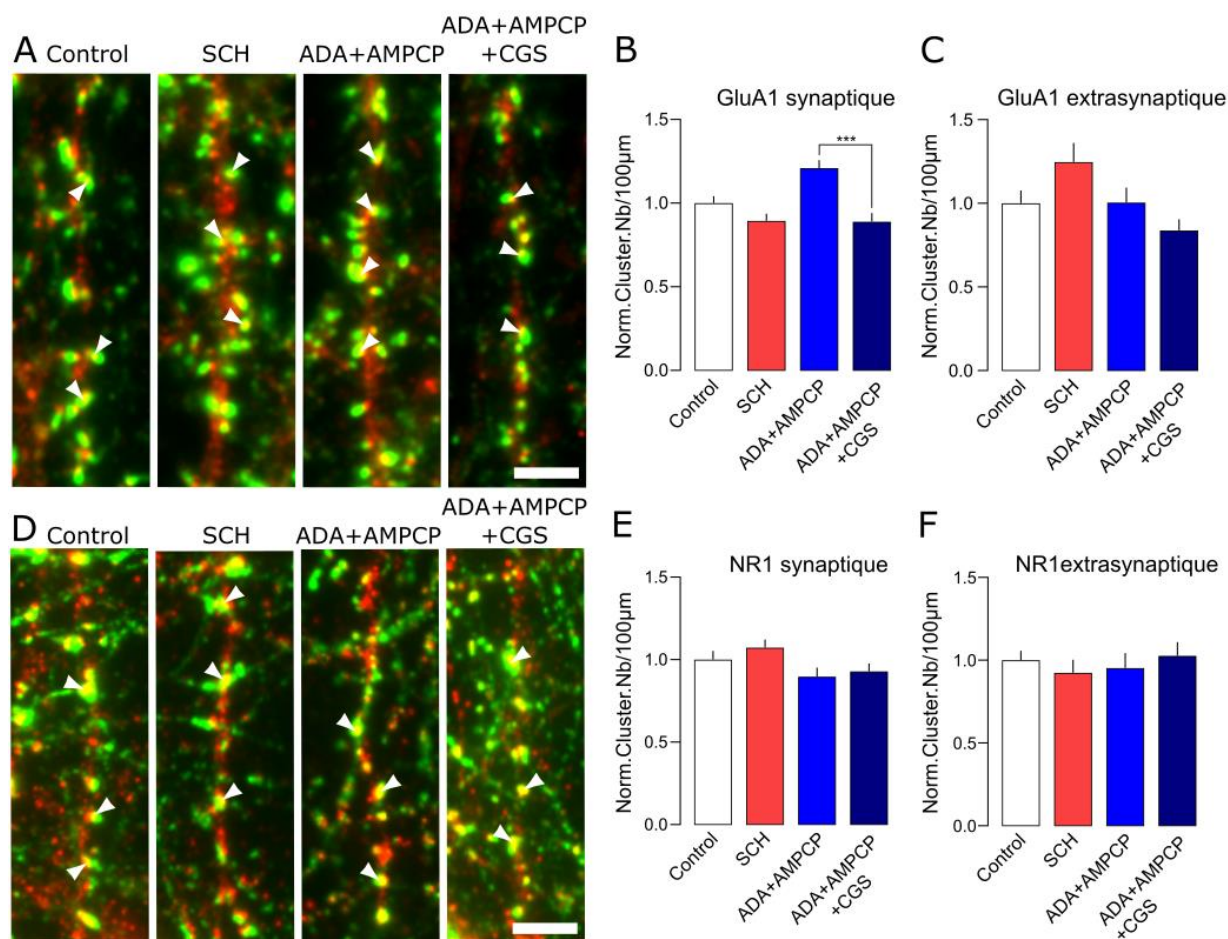


**Figure 12. L'activité des A<sub>2A</sub>Rs contrôle les dynamiques des AMPARs aux synapses glutamatergiques.** (A) Exemples de trajectoires de GluA1 en suivi de molécules uniques dans des neurones hippocampiques à DIV8, exposés ou non au SCH-58261 (SCH, 100nM), à l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS-21260 (CGS, 30nM) (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 0.5 $\mu$ m. (B-F) Quantifications des coefficients de diffusion de GluA1 et de l'aire explorée dans le compartiment extrasynaptique, (B,C) ou synaptique (D, E), et du temps de résidence de GluA1 à la synapse (F) dans des neurones vivants à DIV9, traités avec les drogues indiquées pendant 40 minutes. Le coefficient de

diffusion et l'aire explorée sont plus faibles en présence d'ADA+AMPCP ou de SCH, et augmentent lorsque le A<sub>2A</sub>R est activé avec le CGS en combinaison avec ADA+AMPCP. Le temps de résidence à la synapse augmente en SCH ou ADA+AMPCP et n'est pas modifié par l'activation du A<sub>2A</sub>R avec le CGS. 2 cultures. (B-E) Test Kolmogorov–Smirnov, (F) Test Kruskal-Wallis (n.s. non significatif; \*p≤0.05; \*\*p<0.001; \*\*\*p<0.0001; \*\*\*\*p<0.00001

Ces résultats montrent que la voie A<sub>2A</sub>R contrôle la dynamique des récepteurs glutamatergiques AMPARs à la synapse. Plus précisément, **le blocage du A<sub>2A</sub>R confine les AMPARs à la synapse tandis que l'activation du A<sub>2A</sub>R favorise la diffusion des AMPARs hors de la synapse.** Un échappement des récepteurs des synapses se traduit généralement par une perte en récepteurs à la synapse. J'ai donc cherché à savoir si ces changements de diffusion des récepteurs étaient associés à des remaniements de nombre de récepteurs aux synapses.

Pour étudier l'effet de ces traitements sur la **densité en récepteurs glutamatergiques** aux synapses ou en dehors, j'ai marqué en immunocytochimie les compartiments présynaptiques des synapses excitatrices avec VGLUT1 et les sous-unités GluA1 ou NR1 des récepteurs AMPA ou NMDA (Figure 13 A, D). J'ai analysé la redistribution de ces sous-unités aux synapses glutamatergiques en réponse aux traitements pharmacologiques décrits précédemment, i.e. ADA, AMPCP, CGS ou SCH dans les neurones hippocampiques à DIV8. J'ai observé une perte de 32% des sous-unités des récepteurs AMPA (Figure 13 B-C) mais pas des récepteurs NMDA (Figure 13 E-F) aux synapses qui persistaient après traitement avec l'agoniste en absence d'adénosine extracellulaire. **Ainsi, les changements d'activité du A<sub>2A</sub>R régulent la densité de synapses glutamatergiques pendant le pic de la période de synaptogenèse et redistribuent la PSD-95 et les récepteurs AMPA mais pas les récepteurs NMDA aux synapses glutamatergiques qui persistent.**

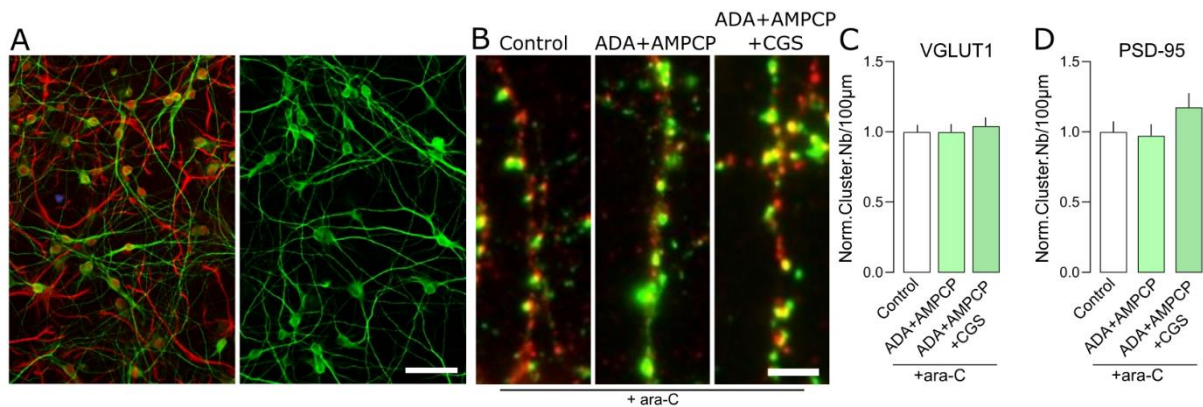


**Figure 13. L'activité du A2AR contrôle la distribution des récepteurs AMPA mais pas NMDA aux synapses glutamatergiques.** (A,D) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et GluA1 (rouge) (A) ou NR1 (rouge) (D) dans des neurones hippocampiques à DIV8 exposés ou non pendant 30 minutes au SCH-58261 (SCH, 100nM), à l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS-21260 (CGS, 30nM) (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 5µm. Les flèches montrent des exemples de synapses excitatrices glutamatergiques co-marquées avec VGLUT1 et les sous-unités GluA1 des AMPARs (A) ou les sous-unités NR1 des NMDARs (D). (B-C) Quantifications du nombre de clusters de GluA1 colocalisés (B) ou non (C) avec VGLUT1 dans des neurones à DIV8 prétraités avec les drogues indiquées pendant 30 minutes. Diminuer l'adénosine extracellulaire a tendance à augmenter la densité des clusters de GluA1 aux synapses glutamatergiques tandis que l'activation des A2ARs avec le CGS dans ces conditions diminue significativement leur densité. N= 34-38 cellules, 2 cultures. (D-F) Le contrôle de la densité des récepteurs glutamatergiques par le A<sub>2A</sub>R est restreint au AMPAR. (E-F) Quantifications du nombre de clusters de NR1 colocalisés (E) ou non (F) avec VGLUT1 dans des neurones à DIV8 prétraités avec les drogues indiquées pendant 30 minutes. Notez l'absence d'effets de ADA+AMPCP et ADA+AMPCP+CGS sur le nombre de clusters synaptiques de NR1. N= 37-39 cellules, 3 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis et post-hoc Dunn : \*\*\*p<0.001.

### Objectif 3. Mécanismes cellulaire et moléculaire de la déstabilisation des synapses glutamatergiques médiée par la voie adénoenergique.

Je viens de montrer que tous les types cellulaires de la culture (neurones, astrocytes et microglies) présentent un pic d'expression du  $A_{2A}R$  pendant la synaptogenèse, et ce récepteur est impliqué dans la stabilisation des synapses glutamatergiques au cours de cette période. Je me suis donc demandé quel(s) étaient le(s) type(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans l'action du  $A_{2A}R$ .

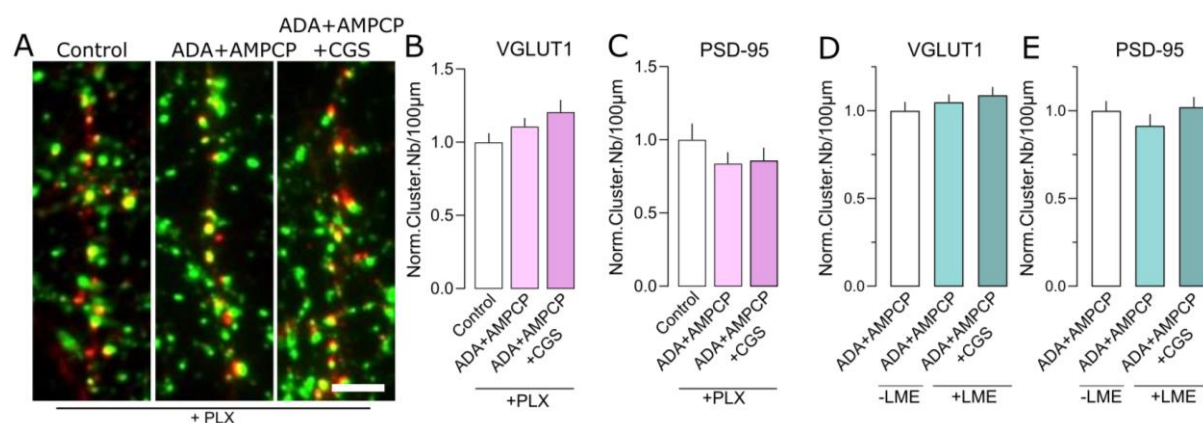
Pour étudier la contribution des différents types cellulaires dans les effets médiés par la signalisation adénoenergique, j'ai commencé par **dépléter la glie et la microglie** avec de l'araboside cytosine (ara-C). J'ai obtenu des cultures pures de neurones puisque l'ara-C supprime >90% des astrocytes et des microglies présentes dans la culture (Figure 14A). Dans ces cultures, j'ai observé que la perte synaptique induite par l'activation du  $A_{2A}R$  en absence d'adénosine extracellulaire est bloquée (Figure 14 B-C) ainsi que les remaniements de PSD-95 aux synapses (Figure 14D). **Ces résultats indiquent que la régulation du remodelage des synapses glutamatergiques par le  $A_{2A}R$  ferait appel à des interactions neurogliales.**



**Figure 14. Contribution des cellules gliales au remodelage des synapses glutamatergiques médié par le  $A_{2A}R$ .** A. Images représentatives des marquages de MAP2 (vert) et de GFAP (rouge), et Iba1 (bleu) dans des cultures mixtes neurones+glie+microglie (- ara-C) ou dans des cultures traitées à l'ara-C (+ara-C). (B) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et PSD-95 (rouge) dans des cultures pures (+ara-C) de neurones hippocampiques à DIV8 exposés ou non pendant 30 minutes à l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS-21260 (CGS, 30nM) (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 5 $\mu$ m. (C-D) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (C), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (D) dans les neurones à DIV8 prétraités avec les drogues indiquées pendant 30 minutes. Sans cellules gliales, l'activation des  $A_{2A}R$ s avec du CGS en absence d'adénosine ambiante n'a pas d'effets sur les synapses glutamatergiques par rapport aux cultures mixtes (Figure 6).

N= 73-75 cellules, 3 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis.

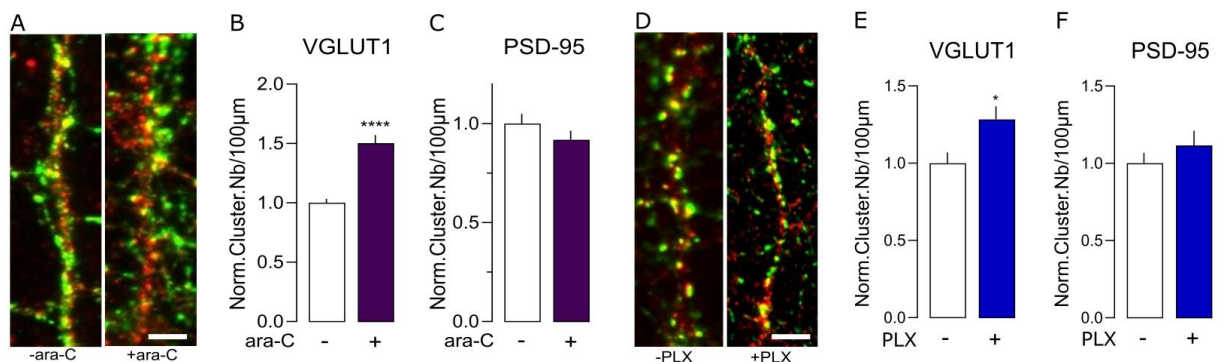
**Pour étudier la contribution des microglies** dans les effets médiés par la signalisation adénoenergique, j'ai déplété les microglies avec du PLX-5622 (4 $\mu$ M), un inhibiteur du récepteur microglial CSF-1 essentiel à la survie des cellules microgliales. Dans ces cultures, j'ai observé un blocage de la perte synaptique induite par l'activation du A<sub>2A</sub>R (Figure 15 A-C). De la même manière, j'ai traité les cellules avec du L-leucine méthylester (LME, 65mM) qui provoque l'apoptose des macrophages et supprime les microglies à 95% dans la culture, sans impacter la survie ou morphologie des astrocytes ou des neurones. J'ai observé le même blocage de la perte des synapses induite par l'activation du A<sub>2A</sub>R (Figure 15 D-E). **Ces résultats indiquent une contribution de la microglie dans la régulation de la synaptogenèse glutamatergique par le A<sub>2A</sub>R.**



**Figure 15 : Le contrôle de la densité des synapses glutamatergiques par le A<sub>2A</sub>R dépend plus spécifiquement des microglies.** (A) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et PSD-95 (rouge) dans des cultures à DIV8 traitées avec du PLX5622 (+PLX, 4 $\mu$ M) exposées ou non pendant 30 minutes à l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -méthyle) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS-21260 (CGS, 30nM) (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 5 $\mu$ m. (B-E) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (B,D), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C,E) dans les neurones à DIV8 prétraités avec les drogues indiquées pendant 30 minutes, lorsque les microglies ont été déplétées avec du PLX5622 (B,C) ou du L-leucine méthylester (+LME, D, E). N(+PLX)= 28-31 cellules, 2 cultures, N(+LME)= 41-43 cellules, 2 cultures. Sans microglies, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs avec du CGS en absence d'adénosine ambiante n'a pas d'effets sur la densité des synapses glutamatergiques par rapport aux cultures mixtes (Figure 6). Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle (B, C) ou de ADA+AMPCP (D, E) ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis



Dans les cultures déplétées en cellules gliales (+ara-C) ou en microglies (+PLX), j'ai observé respectivement 50% et 28% de synapses glutamatergiques en plus à DIV8 (Figure 16A-B, D-E). Au niveau des synapses persistantes, la densité de PSD-95 n'était pas modifiée (Figure 16C, F). L'absence de cellules gliales est néfaste pour le développement des neurones en culture mais il est possible qu'à des stades précoces, la formation des synapses soit favorisée par l'absence des cellules gliales, et par l'activité du réseau de neurones en formation. Cela sous-tend un rôle des cellules gliales dans le contrôle de la synaptogenèse glutamatergique dans notre modèle *in vitro*, en plus de leur possible fonction dans la stabilisation/déstabilisation des synapses excitatrices.



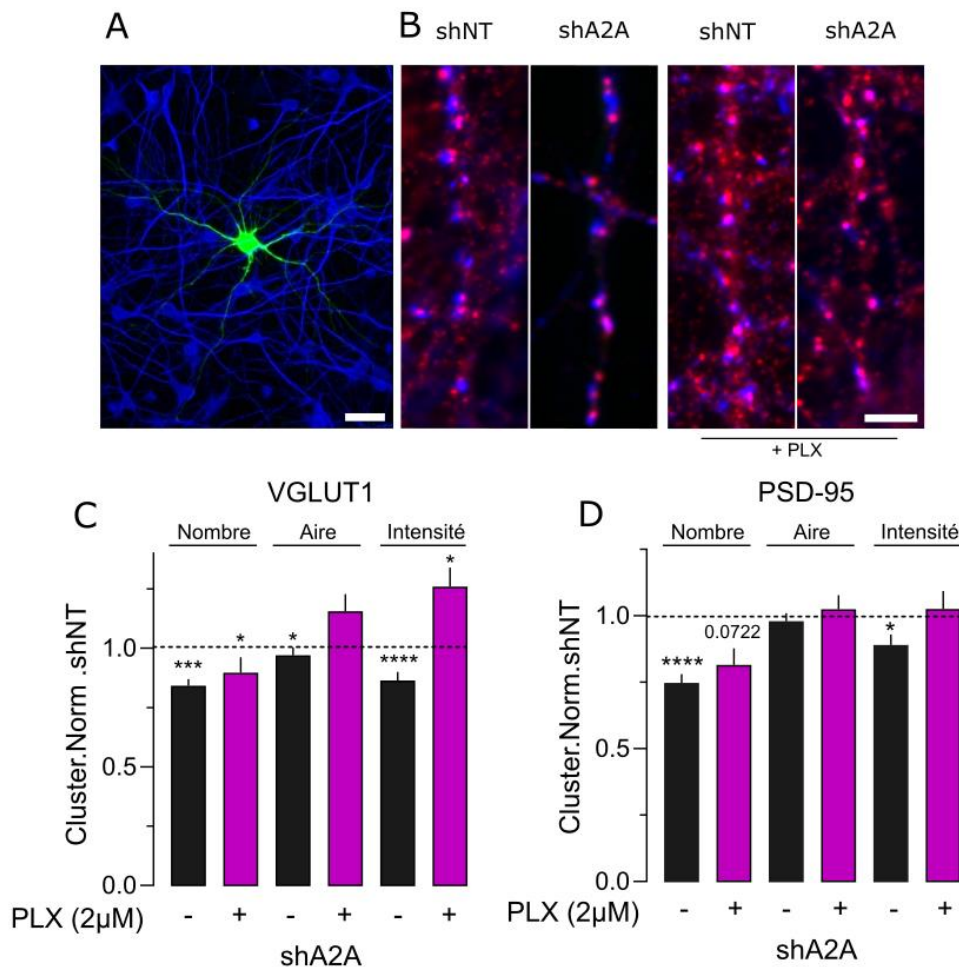
**Figure 16 : Les cellules gliales contrôlent la densité des synapses glutamatergiques au cours de la synaptogenèse.** (A-D) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (B,D), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C,E) dans les neurones à DIV8 en présence d'ara-C (A, B) ou de PLX (C, D). N(+ara-C)= 43-44 cellules, 3 cultures ; N(+PLX)= 30 cellules, 2 cultures. Sans cellules gliales ou sans microglies, la densité des synapses glutamatergiques est plus importante que dans une culture mixte. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Mann-Whitney.

Les cellules gliales, et plus spécifiquement les microglies, participent donc à la régulation de la densité des synapses glutamatergiques via la voie adénoenergique. En l'absence de ces cellules, l'effet de l'activation du  $A_{2A}R$  est opposé à celui obtenu dans une culture mixte neurones-astrocytes-microglies. Cette régulation impliquerait donc des interactions neurogliales.

Pour étudier le rôle spécifique du  $A_{2A}R$  neuronal dans le remodelage des synapses glutamatergiques, j'ai sélectivement supprimé l'expression du  $A_{2A}R$  dans les neurones par ARN interférence (shA2A) dans les cultures mixtes. A DIV9, j'ai marqué par immunocytochimie VGLUT1 et PSD-95, et j'ai observé qu'en supprimant  $A_{2A}R$  uniquement dans une sous-population de neurones (seuls 1/10000 neurones sont transfectés dans la culture, Figure 17A), il y avait une réduction du nombre de 16 % des boutons VGLUT1 sur les dendrites des

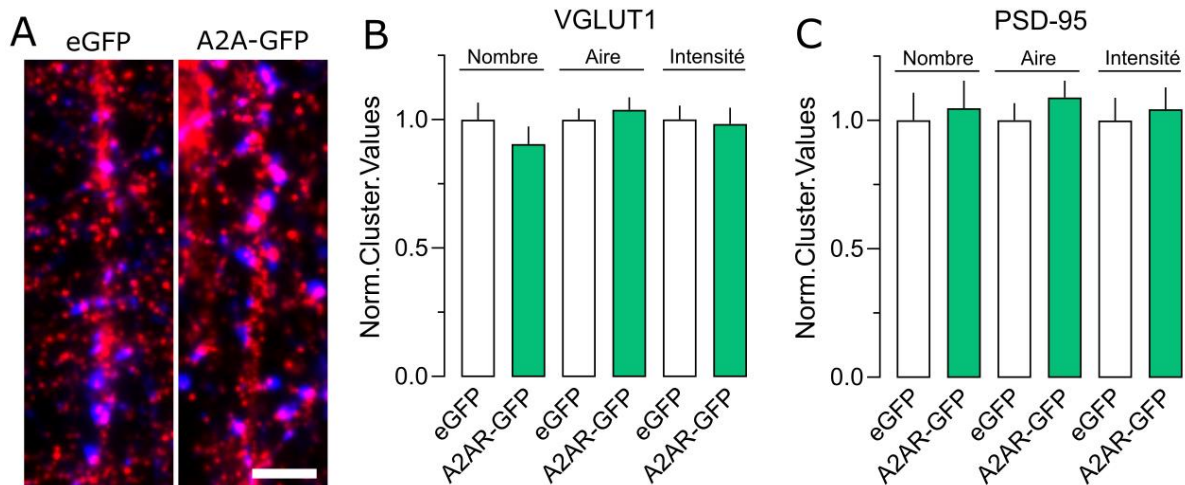
neurones transfectés, indiquant une perte de synapses glutamatergiques. L'aire et l'intensité des agrégats de VGLUT1 étaient aussi diminuées de 3 et 13% respectivement par rapport à la condition shNT (Figure 17 B, C). Aux synapses persistantes, le nombre d'agrégats synaptiques de PSD-95 était également diminué de 26% (Figure 17 B, D), suggérant une perte en PSD-95 à ces synapses. L'intensité des agrégats de PSD-95 était diminuée de 11%. Ces résultats indiquent que **supprimer le A<sub>2A</sub>R neuronal déstabilise les synapses glutamatergiques.**

Les effets du shA2A sur les synapses sont opposés à ceux attendus dans les cultures mixtes en réponse à un blocage pharmacologique du A<sub>2A</sub>R, **suggérant des contributions opposées des A<sub>2A</sub>R neuronaux et gliaux.** La perte synaptique induite par le shA2A est toujours observée dans les cultures traitées avec le PLX-5622 (PLX), avec une perte de 11% des boutons VGLUT1, malgré une augmentation de 26% de l'intensité de ces boutons (Figure 17C). Les effets sont atténués sur la perte en PSD-95 aux synapses persistantes, s'élevant à 19% en présence de PLX, mais non significative (Figure 17D), sans effets sur l'aire ou l'intensité des clusters. Ceci confirme que **l'effet d'une suppression neuronale du A<sub>2A</sub>R sur les synapses glutamatergiques est neurone-dépendant.**



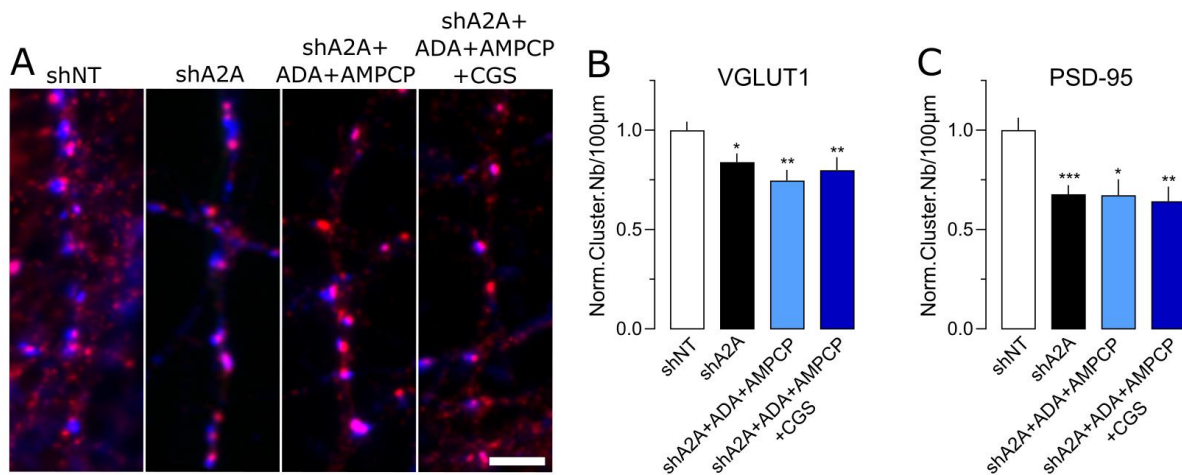
**Figure 17. Le  $A_{2A}R$  neuronal est nécessaire et suffisant pour stabiliser les synapses glutamatergiques in vitro.** (A) Image représentative du marquage MAP2 (bleu) et d'un neurone transfecté avec un plasmide eGFP (vert). Barre d'échelle : 10μm. (B) Images représentatives des marquages VGLUT1 (bleu), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV9 transfectés à DIV6 avec un shARN sans gène cible (shNT)+eGFP ou shARN pour le  $A_{2A}R$  (shA2A)+eGFP et traités (+PLX) ou non avec du PLX5622. Barre d'échelle : 5μm. (C-D) Quantifications du nombre, de l'aire et de l'intensité des clusters présynaptiques VGLUT1 (C), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (D) dans des neurones transfectés avec le shARN indiqué, en présence ou absence de PLX5622. La suppression du  $A_{2A}R$  neuronal induit une perte de synapses glutamatergiques, en présence ou absence de microglies. N=54-148 cellules, 5-9 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle shNT correspondant ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis et post-hoc Dunn : \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Les données indiquent une stabilisation des synapses excitatrices par le A<sub>2A</sub>R neuronal. Je me suis demandée quel effet aurait **une surexpression du A<sub>2A</sub>R neuronal** sur les synapses glutamatergiques. J'ai donc sélectivement surexprimé le A<sub>2A</sub>R dans les neurones en transfectant une construction A<sub>2A</sub>-GFP dans les cultures mixtes. Dans ces cultures à DIV9, j'ai marqué par immunocytochimie les compartiments pré- et post-synaptiques de la synapse excitatrice (Figure 18A). J'ai observé que la surexpression du A<sub>2A</sub>R neuronal uniquement dans une sous-population de neurones n'affectait pas la densité de synapses glutamatergiques ni l'organisation de la PSD-95 aux synapses (Figure 18 B-C).



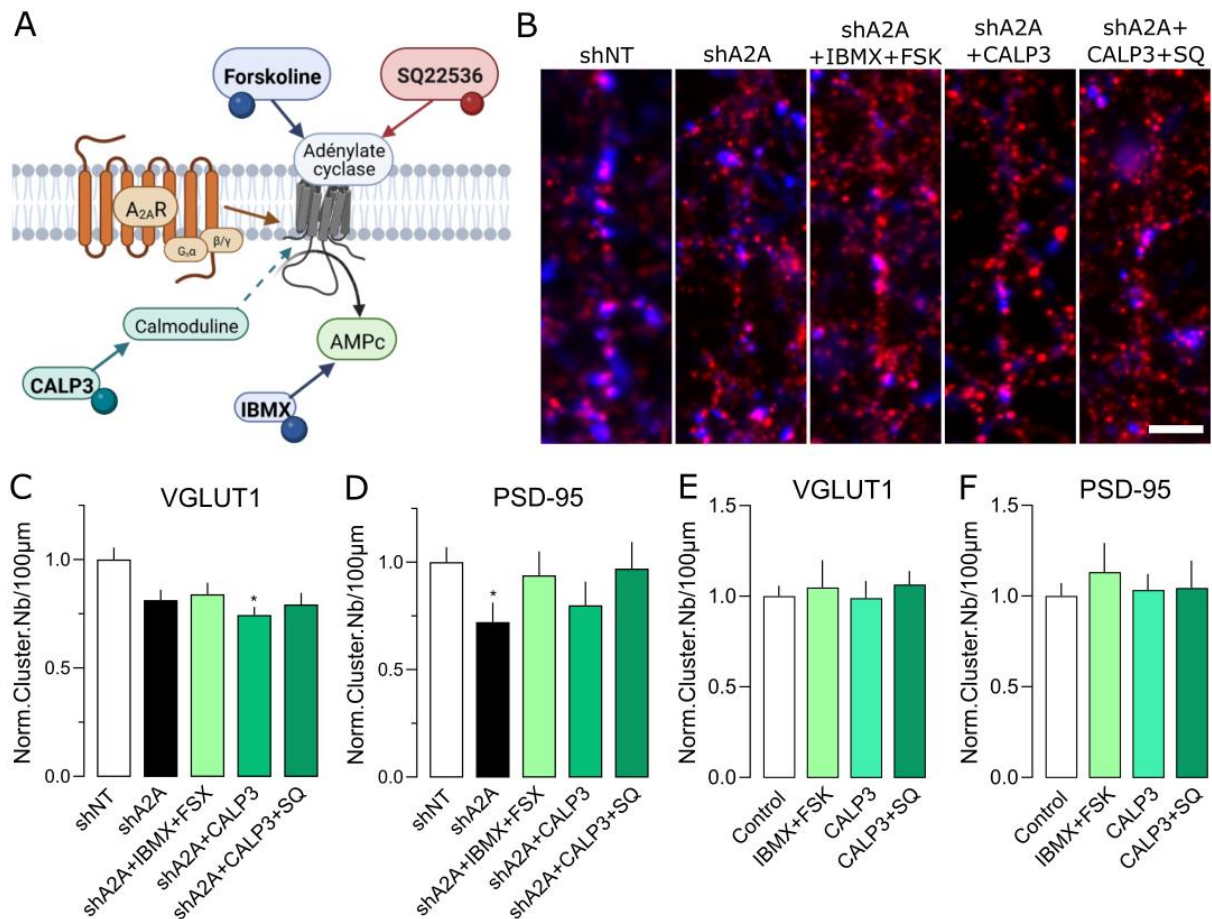
**Figure 18. La surexpression du A<sub>2A</sub>R neuronal n'impacte pas les synapses glutamatergiques.** (A) Images représentatives des marquages VGLUT1 (bleu), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV9 transfectés à DIV6 avec un plasmide eGFP ou A2A-GFP surexprimant le A<sub>2A</sub>R. Barre d'échelle : 5µm. (B-C) Quantifications du nombre, de l'aire et de l'intensité de clusters présynaptiques VGLUT1 (B), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C) dans des neurones transfectés avec le plasmide indiqué. La surexpression du A<sub>2A</sub>R neuronal n'a pas d'effet sur le nombre, l'aire ou l'intensité des clusters pré- ou postsynaptiques glutamatergiques. N= 37-38 cellules, 3 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle eGFP ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Mann-Whitney.

Pour comprendre le rôle du  $A_{2A}R$  neuronal dans la régulation des synapses observées dans la culture mixte, les neurones transfectés avec les shNT ou shA2A ont été traités avec les composés pharmacologiques décrits précédemment, i.e. ADA, AMPCP et CGS. En supprimant le  $A_{2A}R$  neuronal, il y a une réduction de 16% du nombre de boutons VGLUT1 sur les neurones transfectés qui n'est pas récupérée en l'absence d'adénosine extracellulaire (ADA+AMPCP) (réduction de 27%) ou aggravée par l'activation du  $A_{2A}R$  (ADA+AMPCP+CGS) (perte de 21% des synapses) (Figure 19 A-B). Aux synapses persistantes, le nombre d'agrégats synaptiques de PSD-95 est également réduit de 32% et cet effet cellule-autonome de la suppression du  $A_{2A}R$  neuronal n'est pas modifié par la réduction de l'adénosine ambiante (perte de 33% du marquage) ou l'activation des  $A_{2A}R$ s avec le CGS (35% de réduction du marquage) (Figure 19C). Ces résultats indiquent que le  $A_{2A}R$  neuronal est nécessaire pour médier les effets de l'agoniste du  $A_{2A}R$  sur les synapses glutamatergiques dans la culture mixte.



**Figure 19. Le récepteur  $A_{2A}$  neuronal est nécessaire pour induire la perte de synapses glutamatergiques induite par l'agoniste du  $A_{2A}R$  dans les cultures mixtes.** (A) Images représentatives des marquages VGLUT1 (bleu), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV9 transfectés à DIV6 avec un shARN sans gène cible (shNT)+eGFP ou shARN pour le  $A_{2A}R$  (shA2A)+eGFP exposés ou non pendant 30 minutes à l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -méthylène) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS-21260 (CGS, 30nM) (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 5 $\mu$ m. (B-C) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (B), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C) dans des neurones transfectés avec le shARN indiqué, en présence des traitements cités. La suppression du  $A_{2A}R$  neuronal induit une perte de synapses glutamatergiques. La réduction de l'adénosine ambiante ou l'activation des  $A_{2A}R$ s avec le CGS ne modifie pas cet effet. N=28 cellules, 2 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle shNT ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis : \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001

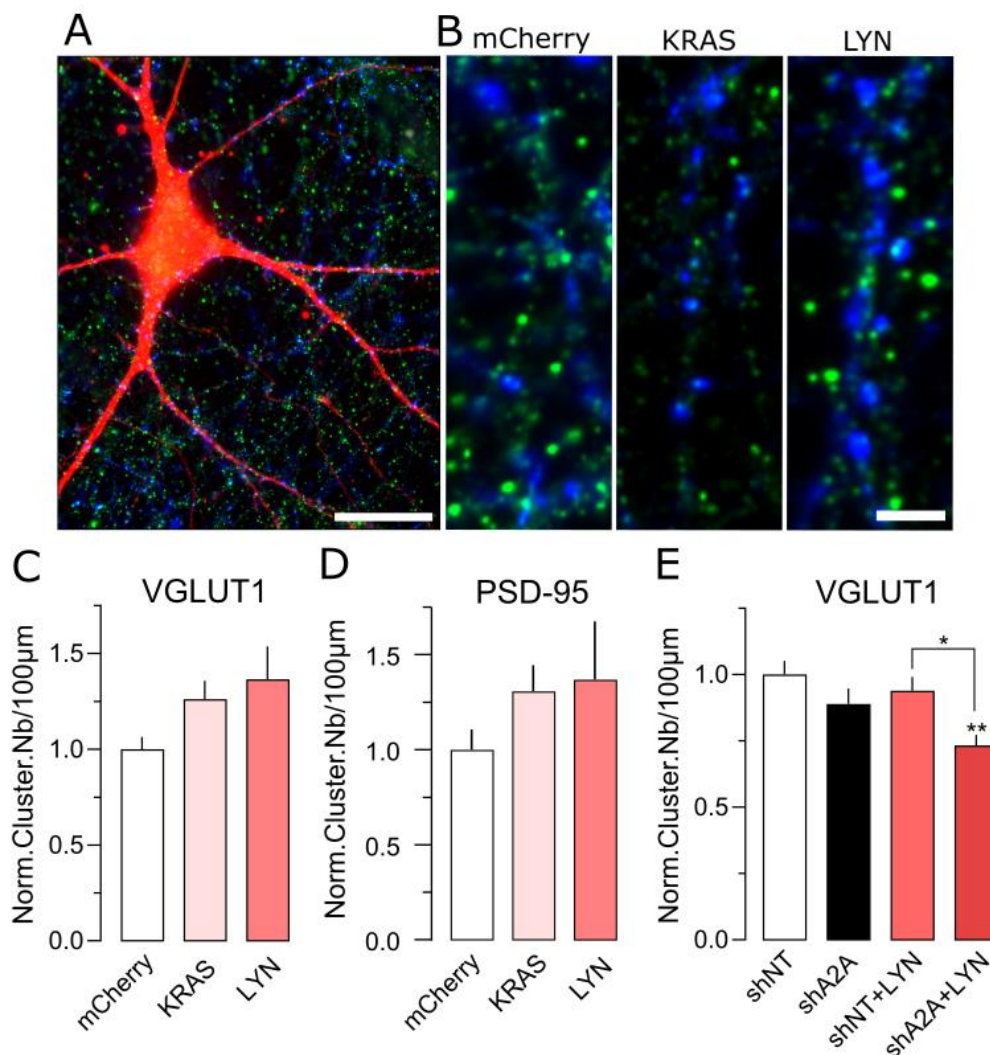
Pour disséquer le **mécanisme moléculaire** des interactions neurogliales liant l'activation de A<sub>2A</sub>R et la régulation de la densité des synapses glutamatergiques, je me suis tout d'abord intéressée à la contribution des adénylates cyclases (AC) activées par le calcium et la calmoduline calcium-dépendante. Le A<sub>2A</sub>R est positivement couplé à l'AC, son activation entraîne la production d'AMPc et l'activation de la PKA et le laboratoire a récemment montré que cette voie de signalisation est responsable de la stabilisation des synapses GABAergiques naissantes de l'hippocampe (Gomez-Castro et al., 2021). J'ai donc étudié les effets de l'augmentation intracellulaire de l'AMPc, en bloquant sa dégradation avec l'IBMX et en activant les ACs avec la forskoline (FSK) (Figure 20A), sur le nombre de synapses glutamatergiques, au niveau des neurones transfectés (Figure 20B-D) ou non (Figure 20E, F) avec un shA2A. J'ai observé que l'augmentation de l'AMPc intracellulaire ne modifie pas la perte synaptique induite par le shA2A dans les neurones (perte de 19% des boutons VGLUT1 en shA2A, et 16% en shA2A+IBMX+FSK ; et perte de 28% des agrégats de PSD-95 en shA2A vs. 7% en présence d'IBMX+FSK) (Figure 20 B-D) et n'a pas d'effet sur les neurones non transfectés de la même culture (Figure 20E-F). De même, l'activation de la calmoduline avec CALP3 avec ou sans SQ22536, un antagoniste de l'AC (Figure 20A), ne change pas le nombre de synapses glutamatergiques dans les neurones exprimant le shA2A (perte de 26 ou 21% des synapses VGLUT1, ou 21% et 3% des agrégats de PSD-95) (Figure 20B-D) ainsi que dans les neurones non transfectés (Figure 20E-F). De plus, lorsque les concentrations d'adénosine extracellulaire sont réduites en présence d'ADA et d'AMPCP, l'augmentation d'AMPc intracellulaire et l'activation simultanée des ACs (IBMX+FSK), ne modifie pas le nombre de synapses glutamatergiques (données non montrées). Ces résultats indiquent que les effets de l'activation du A<sub>2A</sub>R par le CGS ne passeraient pas par son action sur les ACs.



**Figure 20. La stabilisation des synapses glutamatergiques n'implique pas la voie canonique AC/AMPC.** (A) Schéma de la voie AC/AMPC/PKA liée à l'activation d'un RCPG comme le A<sub>2A</sub>R, et du rôle des différentes drogues utilisées pour manipuler la voie i.e. IBMX, FSK, CALP3, SQ. (B) Images représentatives des marquages VGLUT1 (bleu), et PSD-95 (rouge) dans des neurones hippocampiques à DIV9 transfectés à DIV6 avec un shARN sans gène cible (shNT)+eGFP ou shARN pour le A<sub>2A</sub>R (shA2A)+eGFP exposés ou non pendant 30 à IBMX (100μM) + forskoline (10μM, FSK), ou CALP3 (100μM) seul ou en combinaison avec SQ22536 (20μM). Barre d'échelle : 5μm. (C-D) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (C), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (D) dans des neurones transfectés avec les shARN cités, en présence des traitements indiqués. La perte de synapses glutamatergiques induite par la suppression du A2AR n'est pas restaurée par l'activation de l'AC ou de la calmoduline. N=26-29 cellules, 2 cultures. (E-F) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (E), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (F) des neurones non transfectés, en présence des traitements indiqués. L'augmentation de l'AMPC ou l'activation de la calmoduline n'impacte pas le nombre de synapses. N=22 cellules, 2 cultures. Dans les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ou le shNT ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis : \*p<0.05.

De plus, pour cibler l'AMPC local, j'ai utilisé des constructions permettant de tamponner l'AMPC au niveau des radeaux lipidiques (plasmide LYN) ou en dehors (KRAS) (Figure 21). Bloquer l'AMPC dans les radeaux lipidiques ou en dehors ne modifie pas significativement le nombre de synapses glutamatergiques (Figure 21C) ni d'agrégats postsynaptiques de PSD-95 (Figure 21D).

Pour lier le rôle du  $A_{2A}R$  neuronal à l'AMPC, j'ai co-transfecté le shNT ou shA2A avec le plasmide LYN et j'ai analysé le nombre de boutons VGLUT1 sur les dendrites des neurones transfectés. En présence du shA2A, une perte de 12% des boutons VGLUT1 était observée par rapport au shNT, et l'expression de LYN avec un shNT ne modifie pas le nombre de synapses. En revanche, en présence du shA2A et de LYN, on retrouve une perte de 20% des synapses VGLUT1 (Figure 21E). **Lorsque l'AMPC est tamponné au niveau des radeaux lipidiques, le shA2A induit toujours une perte de synapses.**



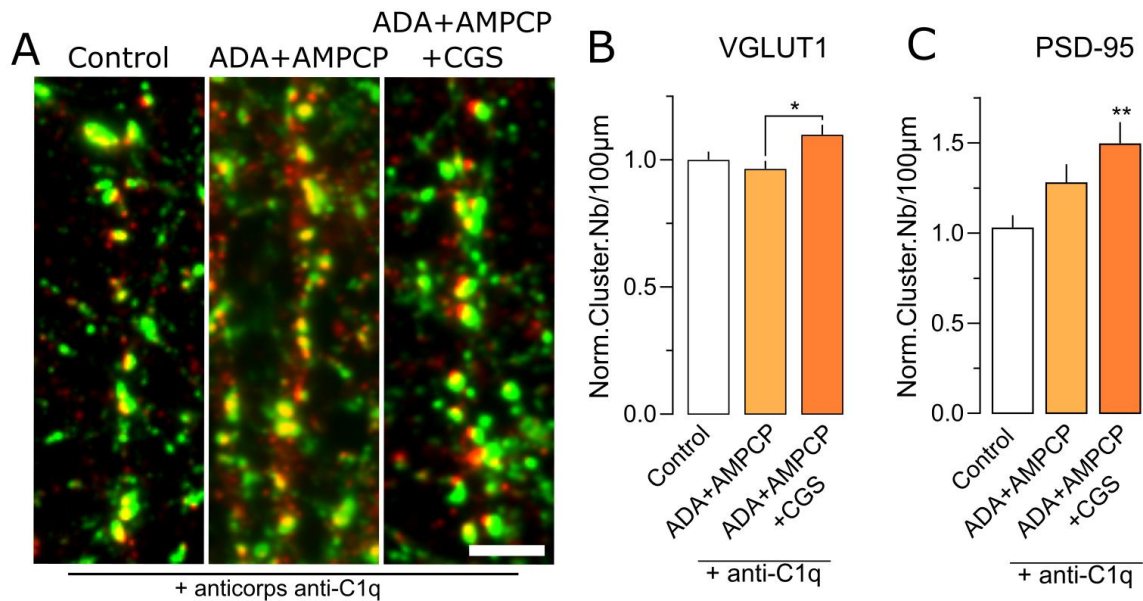
**Figure 21. Les concentrations neuronales d'AMPC intracellulaire ne participent pas à la stabilisation des synapses glutamatergiques.** (A) Image représentative d'un neurone transfecté avec un plasmide mCherry. Barre d'échelle : 10µm. (B) Images représentatives des marquages VGLUT1



(bleu), et PSD-95 (vert) dans des neurones hippocampiques à DIV9 transfectés à DIV6 avec les plasmides mCherry, KRAS, LYN ou LYN mutant, qui régulent les niveaux d'AMPC intracellulaire. Barre d'échelle : 5µm. (C-D) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (C), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (D) dans des neurones transfectés avec les plasmides indiqués. Les éponges neuronales à AMPc ne modifient pas la densité des synapses glutamatergiques. N=16-30 cellules, 2 cultures. (E) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 dans des neurones transfectés avec le shNT ou shA2A et LYN. La perte de synapses glutamatergiques induite par la suppression du A<sub>2A</sub>R n'est pas restaurée par le contrôle de l'AMPC dans les radeaux lipidiques. N= 27-31 cellules, 3 cultures. Dans les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle mCherry ou le shNT ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis : \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Ces données montrent, **qu'à la différence de la synaptogenèse GABAergique, la voie de l'AC/AMPC ne semble pas impliquée dans la régulation de la synaptogenèse glutamatergique.**

L'équipe de David Blum a montré que lorsque le A<sub>2A</sub>R neuronal est surexprimé dans un modèle de tauopathie, une signature microgliale particulière est mise en place impliquant entre autres une **augmentation de l'expression hippocampique de la protéine du complément C1q** (Carvalho et al., 2019). Ces données et le fait que le facteur C1q sécrété par les cellules microgliales soit un facteur clé de l'élagage synaptique m'a incité à explorer la contribution de C1q dans la déstabilisation des synapses glutamatergiques dépendante de A<sub>2A</sub>R. Dans des cultures mixtes exposées 1h à un anticorps bloquant la protéine C1q, j'ai observé que l'activation de A<sub>2A</sub>R par le CGS n'induit pas d'élagage synaptique (Figure 22). Au contraire, j'ai observé dans ces conditions une augmentation significative de 14% du nombre de boutons VGLUT1 et de 21% de la densité des agrégats de PSD-95 en réponse au CGS (par rapport à la condition ADA+AMPCP) (Figure 22). **Ces données suggèrent que le A<sub>2A</sub>R régule l'élimination des synapses glutamatergiques en fonction des niveaux de C1q produit par les microglies.**

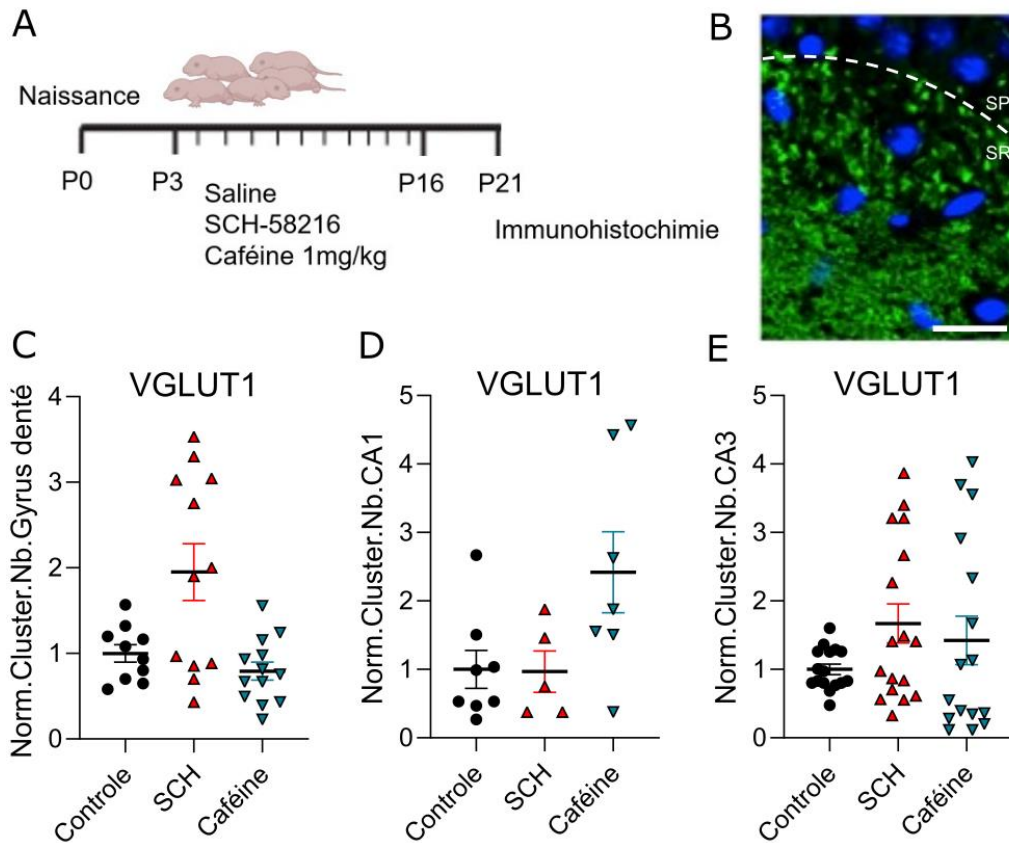


**Figure 22 : La régulation de la densité des synapses médiée par le  $A_{2A}R$  dépend des niveaux de la protéine du complément C1q.** (A) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert), et PSD-95 (rouge) dans des cultures à DIV8 traitées avec l'anticorps bloquant C1q, exposées ou non pendant 1 heure à l'adénosine déaminase (ADA, 2U/mL) et l'adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (AMPCP, 85nM) seules ou en combinaison avec le CGS-21260 (CGS, 30nM) (ADA+AMPCP+CGS). Barre d'échelle : 5µm. (B-C) Quantifications du nombre de clusters présynaptiques VGLUT1 (B), ou postsynaptiques PSD-95 colocalisés avec VGLUT1 (C) dans les neurones à DIV8 prétraités avec les drogues indiquées pendant 1 heure, lorsque C1q a été neutralisé. Notez qu'il y a plus de synapses glutamatergiques lorsque le  $A_{2A}R$  est activé en absence de C1q. N=102-104 cellules, 4 cultures. Dans tous les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs du contrôle ; les histogrammes représentent les moyennes et s.e.m. ; test Kruskal-Wallis, \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ .

Avec l'ensemble des données obtenues *in vitro*, il semble que l'activation de  $A_{2A}R$  à un stade précoce ait un effet délétère sur les synapses glutamatergiques. Le  $A_{2A}R$  neuronal est impliqué dans la régulation de la synaptogenèse glutamatergique et dépend d'une interaction neurogliale. Les synapses glutamatergiques sont aussi modulées via les  $A_{2A}R$ s gliaux et ces deux régulations, neuronale et gliale, sont opposées. Le mécanisme de déstabilisation synaptique sous-jacent implique la protéine C1q mais ne semble pas dépendre des voies AC/AMPc/PKA.

#### **Objectif 4. Le récepteur $A_{2A}$ est-il impliqué dans la régulation des synapses glutamatergiques *in vivo* ?**

Pour déterminer comment la signalisation adénosinergique peut **moduler les processus de stabilisation de la synapse glutamatergique au cours de la synaptogenèse et ses effets sur la mise en place du réseau neuronal *in vivo***, nous avons évalué l'impact à P16 des effets d'un blocage chronique du  $A_{2A}R$  pendant le pic de synaptogenèse (i.e. entre P3 et P16) avec le SCH58261 (i.p. 0.1 mg/kg) ou la caféine (i.p. 1 mg/kg), un antagoniste naturel non sélectif du  $A_{2A}R$  et du  $A_{1}R$  sur la densité des synapses glutamatergiques *in vivo* (Figure 23). Après exposition au SCH ou à la caféine au cours de la période de synaptogenèse (P3 et P16, Figure 23A), le nombre de synapses glutamatergiques a tendance à augmenter dans l'hippocampe des mâles à P21 (Figure 23 B-C), mais ces effets semblent différents entre les régions analysées. En effet, le traitement avec le SCH induirait une augmentation de 90% des synapses dans le gyrus denté (DG) (Figure 23C), pas de différence dans la région CA1 (Figure 23D) et une augmentation de 67% des synapses dans le CA3 (Figure 23E), tandis que le traitement à la caféine induirait une diminution de 21% des synapses dans le DG, et une augmentation de 140% et 42% respectivement dans les régions CA1 et CA3 par rapport au contrôle. Ces résultats ne sont pas significatifs au vu du nombre insuffisant de souris analysées mais montrent des **effets région-dépendants** qu'il reste à investiguer.

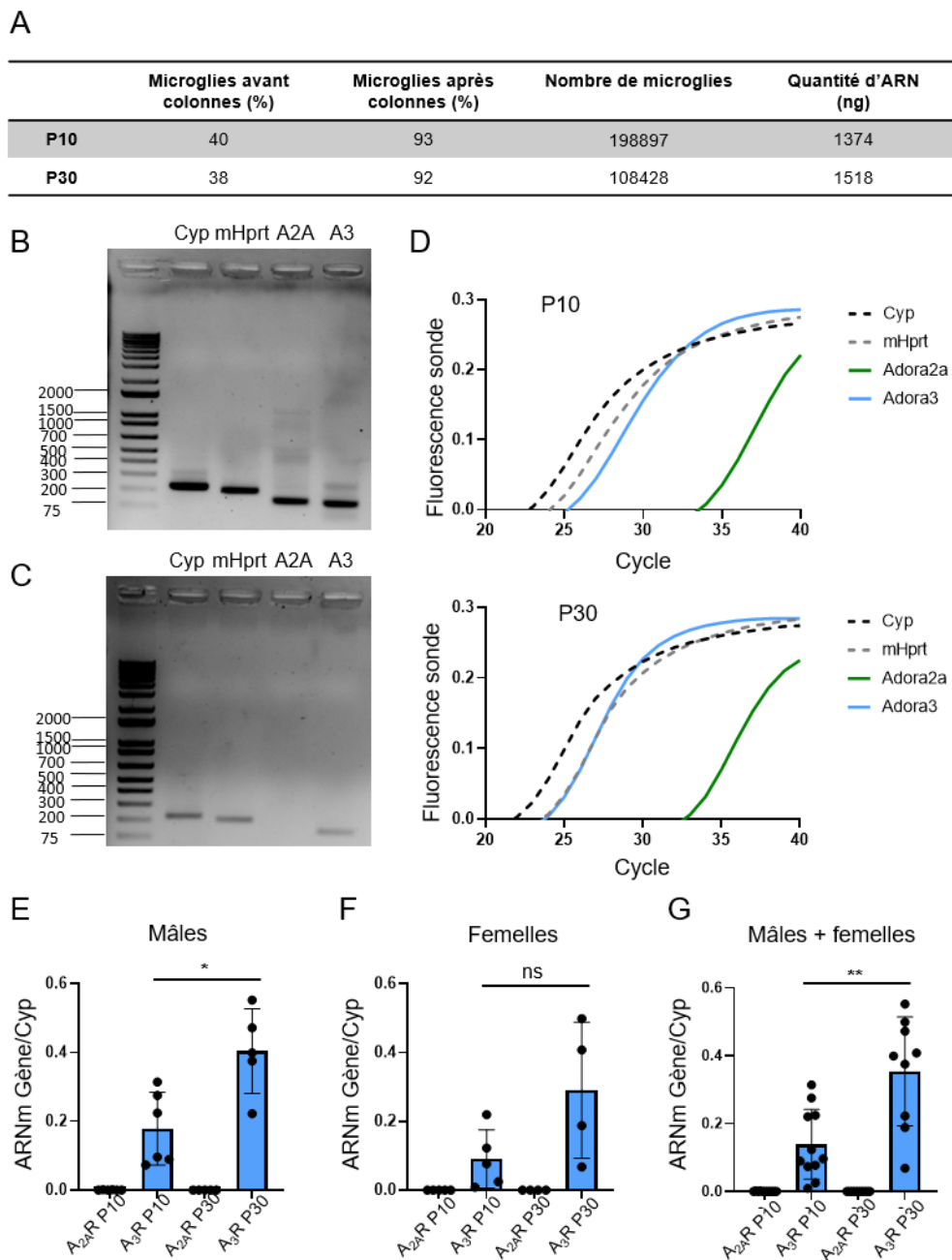


**Figure 23 : Les traitements au SCH ou à la caféine au cours de la synaptogenèse induisent un gain de synapses glutamatergiques *in vivo* chez les mâles.** (A) Vue d'ensemble du protocole d'injection *in vivo* de solution saline (contrôle), SCH58261 (0.1mg/kg) ou caféine (1mg/kg) des souriceaux entre P3 et P16 avant la réalisation des immunohistochimies sur tranches de cerveaux mâles à P21. (B) Images représentatives des marquages VGLUT1 (vert) et DAPI (bleu) dans la région CA3 de l'hippocampe. SP : stratum pyramidale, SR : stratum radiatum. Barre d'échelle : 20µm. (C) Quantification de la densité des synapses glutamatergiques marquées par VGLUT1 après les traitements indiqués dans les régions du gyrus denté, CA1 et CA3 de l'hippocampe. Notez que le nombre de synapses glutamatergiques a tendance à augmenter dans l'hippocampe des mâles à P21 après exposition au SCH ou à la caféine, en fonction des régions, au cours de la synaptogenèse. Dans les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport au contrôle, les points représentent chacun une tranche de cerveau et correspondent aux moyennes et s.e.m. N= 3 mâles par condition. Les p-value des conditions pour lesquelles les traitements semblent avoir un effet : Gyrus denté :  $p(c/SCH)=0,1072$  ; CA1 :  $p(c/caf)=0,0573$  ; CA3 :  $p(c/SCH)=0,2135$ .

**Objectif 5. Le récepteur A<sub>2A</sub> microglial est-il impliqué dans la stabilisation des synapses glutamatergiques au cours du développement *in vivo* ? Est-ce que les microglies expriment le récepteur A<sub>2A</sub> pendant le pic de synaptogenèse ? Quels sont les effets de la modulation du A<sub>2A</sub>R au stade périnatal sur le phénotype des microglies ?**

Pour comprendre le rôle du A<sub>2A</sub>R *in vivo* au cours de la synaptogenèse et son implication potentielle dans une régulation des microglies, je me suis demandée si les microglies exprimaient le A<sub>2A</sub>R, puis j'ai étudié l'impact du blocage global du A<sub>2A</sub>R au cours de la synaptogenèse sur les capacités phagocytaires des microglies.

En collaboration avec Solen Rimbart, nous avons étudié *in vivo* **l'expression du récepteur A<sub>2A</sub> dans les microglies de l'hippocampe pendant le pic de synaptogenèse et à la fin de ce pic**. Pour cela, nous avons purifié des microglies au cours de la synaptogenèse (P10) ou à la fin de la synaptogenèse (P30) et avons comparé l'expression des ARN messagers (ARNm) des récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>3</sub>, à partir de cortex et hippocampes de souris mâles et femelles. Après liaison de billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD11b spécifiques des microglies, ces dernières ont été isolées avec un taux de purification supérieur à 90%, et les ARNm microgliaux ont été extraits (Figure 24A). Après sélection des amorces pour amplifier les gènes codant pour A<sub>2A</sub>R et A<sub>3</sub>R, les ARNm de ces récepteurs ont été détectés par RT-qPCR (réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel), ainsi que les gènes de référence (Cyp et mHprt) à partir d'ARNm de cerveaux totaux de souris (Figure 24B). En revanche, seul le A<sub>3</sub>R est détecté à partir d'ARNm de microglies issues de souris à P10 (Figure 24C) ce qui suggère un très faible taux d'ARNm de A<sub>2A</sub>R microglial pendant le pic de synaptogenèse. De plus, la détection du A<sub>2A</sub>R au cours de la RT-qPCR dans les microglies à P10 ou P30 a lieu après 30 cycles d'amplification, ce qui confirme une faible expression du A<sub>2A</sub>R quel que soit le stade de développement (Figure 24D). L'expression du gène du récepteur A<sub>3</sub> augmente significativement chez les souris mâles entre P10 et P30 (Figure 24E), et une même tendance est observée chez les femelles (Figure 24F). En regroupant les données des deux sexes, l'augmentation de l'expression du A<sub>3</sub>R entre P10 et P30 est significative (Figure 24G). Ces données montrent que **l'ARNm codant pour A<sub>3</sub>R augmente dans les microglies aux stades tardifs du développement, tandis que l'ARNm d'A<sub>2A</sub>R est faiblement détecté dans les microglies, quel que soit le stade développemental**.

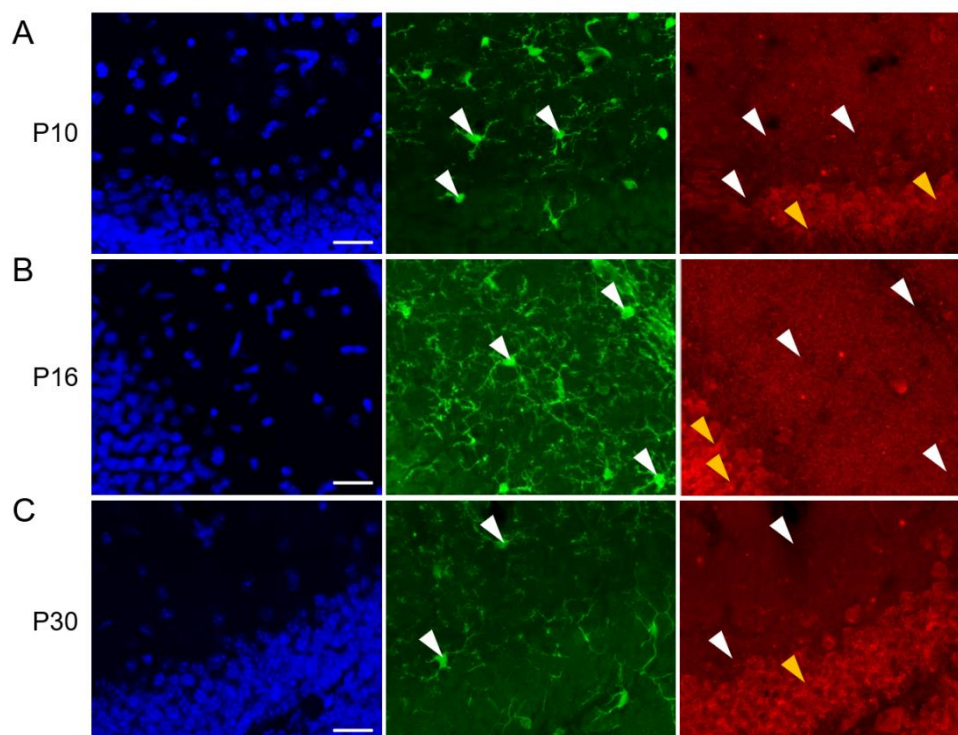


**Figure 24 : Taux d'expression des transcrits des récepteurs à l'adénosine A2A et A3 dans les microglies pendant la synaptogenèse.** (A) Taux de purification des microglies et quantités moyennes d'ARN obtenues à partir de souris P10 (n=19) et P30 (n=20) avant et après la purification avec les billes magnétiques anti-CD11b. (B-C) Gel d'électrophorèse des produits de PCR réalisés à partir des ADNc des gènes de ménage cyclophiline (Cyp) et hypoxanthine phosphoribosyle transférase (mHprt) et des récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>3</sub>. Les ADNc sont produits après transcription inverse des ARNm de cerveau total d'une souris adulte, amplifiés sur 40 cycles (B) ou de microglies purifiées de souris à P10 amplifiés sur 28 cycles (C). (D) Courbes d'amplification de l'ADNc de Cyp (pointillés noirs), mHprt (pointillés gris), A<sub>2A</sub> (vert) et A<sub>3</sub> (bleu) par réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qRT-PCR) de microglies purifiées de souris mâles à P10 (haut) et P30 (bas). (E-G) Quantifications de l'expression des ADNc de A<sub>2A</sub> et A<sub>3</sub> dans les microglies à P10 et P30 chez des souris mâles (E), des souris femelles (F), ou les deux sexes (G). Notez que l'expression du A<sub>2A</sub>R microglial est très faible à P10 ou P30. L'expression du A<sub>3</sub>R augmente à l'âge adulte par rapport à P10. L'expression des gènes est normalisée

par rapport au gène de référence Cyp et les données exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. N<sub>mâles</sub> P10 = 6, N<sub>mâles</sub> P30 = 5, N<sub>femelles</sub> P10 = 5, N<sub>femelles</sub> P30 = 4. Test de Mann-Whitney \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

Dans un second temps, nous avons évalué l'expression du A<sub>2A</sub>R au niveau protéique. Nous avons marqué A<sub>2A</sub>R et Iba1 par immunohistochimie sur des tranches d'hippocampe de souris à P10 ou P30 (Figure 25).

A P16, le marquage microglial Iba1 est présent au sein des différentes couches de cellules de l'hippocampe, et le marquage du A<sub>2A</sub>R au niveau du soma des neurones de la couche granulaire du gyrus denté ainsi qu'au sein de la couche moléculaire où se trouvent leurs neurites (Figure 25B). A P10, P16 ou P30, le marquage du A<sub>2A</sub>R est faible dans les corps cellulaires des microglies, immunomarquées avec Iba1, alors que le A<sub>2A</sub>R est fortement exprimé dans le soma des neurones, au niveau de la couche granulaire (Figure 25 A-C). Le faible marquage ponctiforme du A<sub>2A</sub>R dans la couche granulaire ne colocalise pas strictement avec le marquage Iba1, ce qui suggère que le A<sub>2A</sub>R est présent le long des dendrites des cellules granulaires. En comparant les intensités de fluorescence du A<sub>2A</sub>R dans le soma des neurones de la couche granulaire et des microglies au même stade, l'immunoréactivité du A<sub>2A</sub>R était toujours plus forte dans les neurones que dans les microglies que ce soit pendant (Figure 25A), à la fin (Figure 25B) ou après (Figure 25C) la période de synaptogenèse.



**Figure 25 : Faible détection du récepteur A<sub>2A</sub> dans les microglies pendant et après la période de synaptogenèse in vivo.** (A-C) Images confocales représentatives des marquages DAPI (bleu), Iba1 (vert) et A<sub>2A</sub>R (rouge) dans le gyrus denté de souris à P10 (A), P16 (B) ou P30 (C). Les images sont des projections de l'intensité moyenne des marquages sur 12 $\mu$ m de tissu. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. Notez

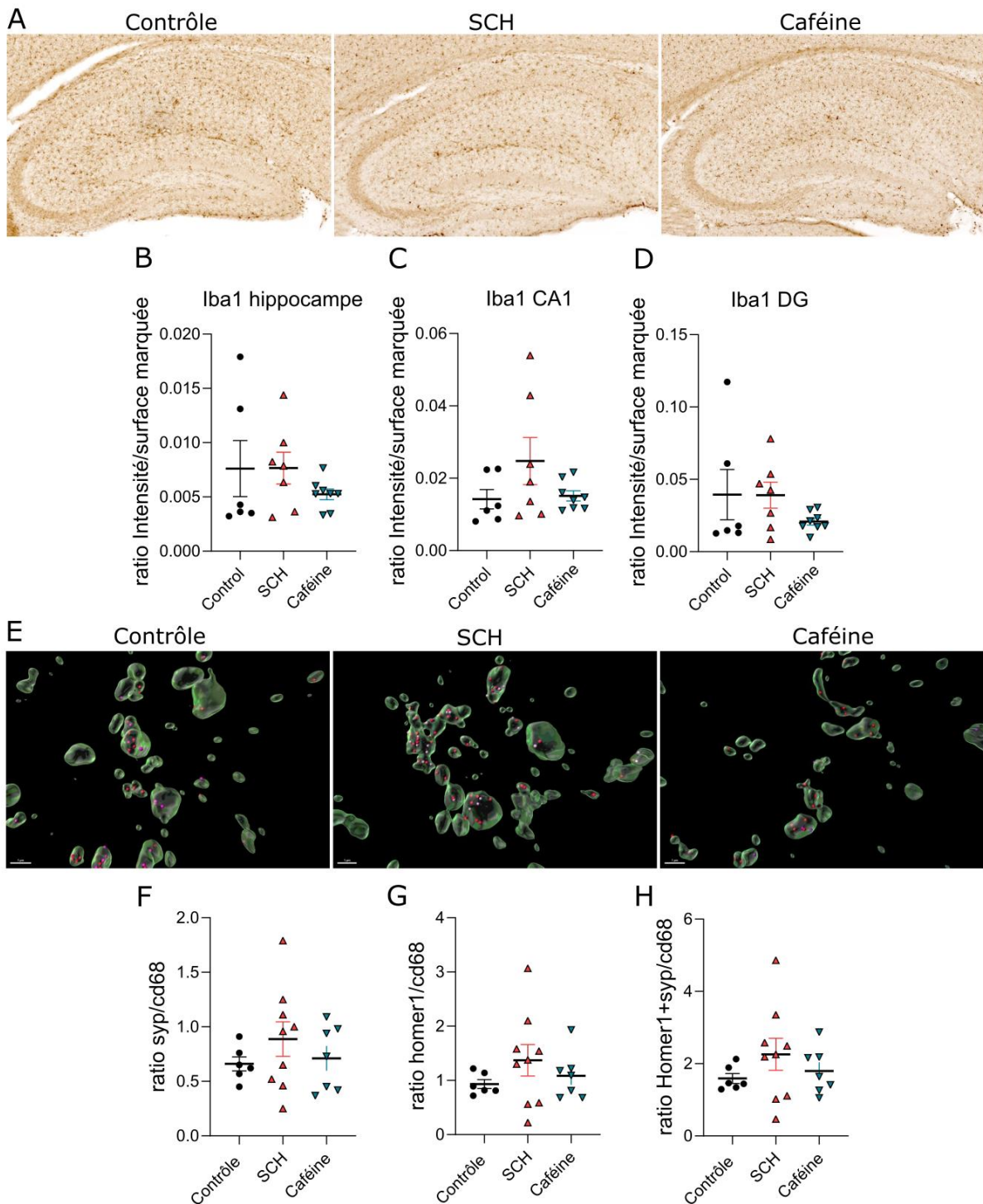
que le A<sub>2A</sub>R est détecté dans les somas des neurones de la couche granulaire (flèches jaunes) alors que ce signal est très faible dans les corps cellulaires des microglies (flèches blanches) à tous les âges étudiés.

Ces données montrent que **le A<sub>2A</sub>R est faiblement exprimé au niveau génique et protéique dans les microglies au cours de la synaptogenèse**, et suggèrent un faible rôle du récepteur A<sub>2A</sub> microglial au cours de cette période. La régulation des synapses glutamatergiques par la voie adénoenergique décrite précédemment *in vitro* reposerait donc sur les A<sub>2A</sub>R neuronaux, au centre de la régulation, et peu sur les A<sub>2A</sub>Rs microgliaux.

Bloquer la signalisation adénoenergique au cours de la synaptogenèse *in vivo* induit une stabilisation des synapses excitatrices sur le long terme. Les A<sub>2A</sub>Rs pourraient-ils agir sur les processus d'élimination de synapses par les microglies au cours du développement ?

En collaboration avec Emilie Faivre, nous avons étudié **le rôle de la signalisation adénoenergique sur l'activité phagocytaire des microglies de l'hippocampe**. Nous avons analysé en microscopie confocale dans l'hippocampe des animaux mâles traités à la solution saline, au SCH ou à la caféine au cours de la synaptogenèse (Figure 23A), le nombre et la morphologie des microglies grâce à un marquage Iba1 (Figure 26A) et leur capacité à phagocyter les synapses glutamatergiques en co-marquage de CD68 et Homer et Synaptophysine (Syp) (Figure 26E). La densité de microglies chez les mâles ne varie pas dans l'hippocampe, dans les régions CA1 ou du DG (Figure 26 A-D) après traitement avec le SCH ou la caféine au cours de la synaptogenèse *in vivo*. Chez les mâles traités avec du SCH, nous avons observé **plus de matériel synaptique (Homer1, Syp) dans les lysosomes microgliaux marqués avec CD68** (Figure 26 E-H). Plus de 40% de Homer1, 20% de Syp et plus 40% de Homer1 colocalisés avec Syp ont été retrouvés dans les lysosomes chez ces mâles par rapport au contrôle.





**Figure 26 : Cellules microgliales et activité phagocytaire suite au blocage des  $A_{2A}R$  avec le SCH ou la caféine au cours de la synaptogenèse.** (A) Images représentatives du marquage Iba1 dans l'hippocampe de souris mâles à P18, traitées avec une solution saline, du SCH58261 (0,1mg/kg) ou de la caféine (1mg/kg) entre P3 et P16 (voir figure 23A). (B-D) Quantifications de l'intensité moyenne dans l'hippocampe total (B), dans la région CA1 (C) ou dans le gyrus denté (D). Dans les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport à la surface marquée, les points représentent chacun une tranche de cerveau et correspondent aux moyennes et s.e.m. (E) Images représentatives de l'analyse en 3 dimensions des marquages Homer1 (rouge) ou synaptophysine (Syp, magenta), et CD68 (vert).

Barre d'échelle : 1µm. (F-H) Quantifications du nombre de clusters synaptiques inclus dans le marquage des lysosomes microgliaux CD68 dans la région CA1. Dans les graphiques, les valeurs ont été normalisées par rapport au contrôle, les points représentent chacun une tranche de cerveau et correspondent aux moyennes et s.e.m.

Le blocage des A<sub>2A</sub>Rs au cours de la synaptogenèse induit donc une augmentation de la densité des synapses glutamatergiques sans affecter la densité des microglies, mais pourrait favoriser leur activité phagocytaire.

Pour conclure, les résultats obtenus indiquent que **la signalisation adénoenergique au cours du développement a une fonction dans la stabilisation des synapses glutamatergiques de l'hippocampe**. Le A<sub>2A</sub>R neuronal aurait un rôle central dans cette signalisation qui dépendrait d'interactions neurogliales.

## DISCUSSION

Au cours de ce projet de thèse, je me suis intéressée au rôle des récepteurs A<sub>2A</sub> dans la synaptogenèse glutamatergique de l'hippocampe.

Nous avons montré que l'expression du A<sub>2A</sub>R aux synapses excitatrices et dans les cellules gliales augmente au cours de la synaptogenèse. Le A<sub>2A</sub>R régule la densité des synapses excitatrices spécifiquement au cours de la période de formation des synapses (à DIV7 mais pas à DIV21). L'activation du A<sub>2A</sub>R, uniquement en absence d'adénosine extracellulaire, induit une perte de synapses glutamatergiques et augmente la diffusion des sous-unités GluA1 des AMPARs postsynaptiques. Le blocage du récepteur favorise le confinement de ces sous-unités aux synapses. Paradoxalement, la suppression du A<sub>2A</sub>R neuronal induit une perte de synapses suggérant que le A<sub>2A</sub>R neuronal stabiliserait les synapses glutamatergiques. En fait, la déstabilisation des synapses induite par l'agoniste du A<sub>2A</sub>R est bloquée par la suppression des cellules gliales ou microgliales, ce qui indique que le mécanisme de régulation des synapses glutamatergiques implique des interactions neurogliales. L'activation du A<sub>2A</sub>R microglial, ou d'un autre facteur microglial modulé par le A<sub>2A</sub>R neuronal, induirait donc une déstabilisation des synapses glutamatergiques, à l'inverse du récepteur neuronal. Les régulations décrites ne passent pas par les voies canoniques liées à l'activation du A<sub>2A</sub>R neuronal (AMPc/AC ou MAPK). En revanche, la présence d'un anticorps bloquant la protéine du complément C1q empêche la déstabilisation des synapses, ce qui suggère que C1q contribuerait aux mécanismes de stabilisation/déstabilisation des synapses glutamatergiques au sein desquels le A<sub>2A</sub>R neuronal serait central.

Les données présentées dans ce manuscrit ainsi que celles générées précédemment dans l'équipe du Dr Sabine Lévi permettent de mettre en évidence **la contribution du A<sub>2A</sub>R dans la stabilisation des synapses GABAergiques et glutamatergiques naissantes au cours de la synaptogenèse dans l'hippocampe**. Les régulations décrites sont importantes pour la mise en place des circuits neuronaux et le maintien de l'homéostasie dans le SNC sur le long terme. La densité et la fonction de synapses glutamatergiques ou GABAergiques dans le cerveau déterminent l'homéostasie des réseaux de neurones, et en cas d'altération de cette **balance excitation/inhibition**, des pathologies peuvent émerger.

En se basant sur les résultats obtenus, nous discuterons dans cette partie (1) des voies moléculaires possibles pour médier les processus de stabilisation des synapses glutamatergiques naissantes à partir du A<sub>2A</sub>R neuronal, (2) des pistes sur les interactions entre neurones et microglies pouvant médier la stabilisation/déstabilisation des synapses glutamatergiques, (3) du rôle de l'adénosine extracellulaire et de l'activité dans ces régulations, (4) de la spécificité des effets sur les synapses glutamatergiques ou GABAergiques et des

conséquences sur les réseaux neuronaux hippocampiques. Nous confronterons les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, tout en précisant les limites expérimentales des travaux présentés et des propositions pour les contourner.

Au cours du développement, certaines synapses seraient « destinées » à être éliminées par les microglies, et il existe un modèle dans lequel les neurones moins actifs commencent à se rétracter, les synapses à **se fragmenter** avant la phagocytose par les microglies. La fractalkine sert de signal de recrutement de la microglie aux synapses. Les synapses sont ensuite tagguées avec des signaux « eat-me » du complément et phagocytées par les microglies qui possèdent les récepteurs à ces signaux (Schafer and Stevens, 2015). Il est en effet difficile de savoir si les synapses sont intactes au moment où elles sont phagocytées ou si elles sont déjà amoindries.

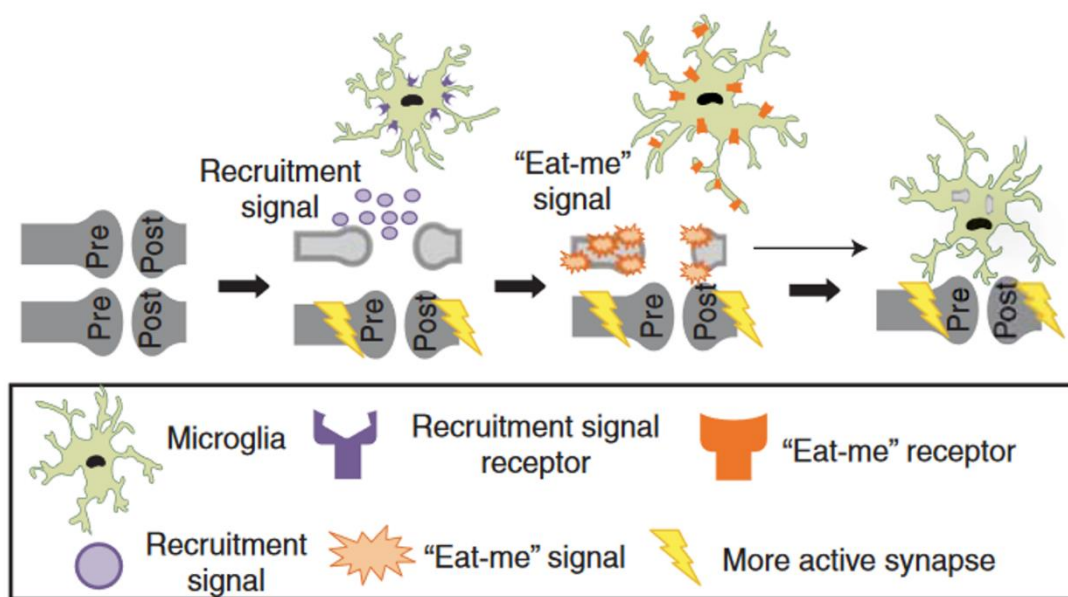


Illustration d'un modèle de fragmentation des synapses avant leur phagocytose par la microglie (Schafer and Stevens, 2015)

L'hypothèse est que le  $A_{2A}R$  neuronal permet de détecter finement l'activité des synapses GABAergiques (Gomez-Castro et al., 2021) et glutamatergiques au cours de la synaptogenèse. Dans le cas des synapses excitatrices, une signalisation supplémentaire serait mise en place à cette période, impliquant les microglies. Si les synapses excitatrices peuvent être reconnues par les microglies et éliminées, il y aurait en fait une étape qui précéderait cette reconnaissance et dans laquelle le  $A_{2A}R$  neuronal aurait un rôle central. Au cœur d'une signalisation dont les mécanismes restent à décrire, le  $A_{2A}R$  favoriserait donc la stabilisation des synapses glutamatergiques, ou leur déstabilisation en absence de cette signalisation. Les synapses stabilisées sur le plus long terme seraient maintenues, et celles déstabilisées et donc moins efficaces, seraient éliminées par la suite. La stabilisation des synapses dans l'hippocampe par la signalisation adénosinergique pourrait donc coder pour

des mécanismes de stockage de l'information sur le long terme, tandis que la déstabilisation des synapses et leur réarrangement subséquent favoriserait le raffinement de l'information et sa modification par l'expérience (De Paola et al., 2003).

### **1. Voies moléculaires possibles dans les processus de stabilisation des synapses glutamatergiques naissantes à partir du A<sub>2A</sub>R neuronal**

L'expression du A<sub>2A</sub>R, même si elle est plus faible que dans le striatum, a été décrite dans l'hippocampe (Lopes et al., 2004). Dans cette région, l'expression du A<sub>2A</sub>R augmente au cours de la période de synaptogenèse et les A<sub>2A</sub>Rs sont principalement enrichis au niveau des synapses (Gomez-Castro et al., 2021). Des techniques d'immunocytochimie, d'analyse ultrastructurale et de microscopie à super-résolution STORM nous ont permis de quantifier et visualiser **l'expression pérисynaptique du A<sub>2A</sub>R aux synapses glutamatergiques au cours de la synaptogenèse**. Dans les cultures de neurones hippocampiques (présentées en **figure 1**), l'analyse d'immunocytochimies a révélé que les A<sub>2A</sub>Rs étaient localisés aux synapses glutamatergiques et que la densité des agrégats aux synapses augmentait au cours de la période de synaptogenèse entre DIV7 et DIV14. La visualisation en microscopie STORM des A<sub>2A</sub>Rs a confirmé leur enrichissement à proximité des synapses glutamatergiques à DIV7 par rapport à DIV21 (**Figure 3**). L'analyse en microscopie électronique du A<sub>2A</sub>R indique que la localisation des A<sub>2A</sub>Rs est pérисynaptique au cours du développement, et aussi présynaptique dans la région CA1 de l'hippocampe. A P30, les récepteurs ont été localisés dans les zones postsynaptique et présynaptique. Il est donc possible que le A<sub>2A</sub>R change de localisation au cours du développement. L'expression présynaptique du A<sub>2A</sub>R à P7 ou P30 serait liée à sa fonction de régulation de libération de neurotransmetteur (Rebola et al., 2005; Sebastião and Ribeiro, 2015), tandis que sa localisation pérисynaptique au cours de la synaptogenèse suggère une fonction particulière du récepteur à cette période (**Figures 4-5**).

Cohérente avec un rôle du A<sub>2A</sub>R neuronal dans la stabilisation des synapses excitatrices dans l'hippocampe, la suppression du A<sub>2A</sub>R neuronal induit une perte de synapses glutamatergiques (**Figure 17**). De manière intéressante, une perte identique est observée pour les synapses GABAergiques (Gomez-Castro et al., 2021), ce qui indique que les régulations de la stabilisation des synapses par le A<sub>2A</sub>R neuronal seraient médiées par un processus commun.

## Quelle voie de signalisation médiée par le A<sub>2A</sub>R neuronal serait impliquée dans la stabilisation de la synapse glutamatergique ?

Au niveau de la synapse GABAergique, les processus de stabilisation des protéines d'échafaudage synaptique et du GABA<sub>A</sub>R médiés par le A<sub>2A</sub>R et le GABA<sub>A</sub>R ont été décrits en introduction (voir partie 2.3.2.1). Ils impliquent l'activité des ACs calcium- et calmoduline-dépendantes, AC1 et AC8, exprimées au niveau de l'hippocampe, et **les voies de signalisation AC/AMPC/PKA**.

Dans notre modèle de synapses glutamatergiques au cours de la synaptogenèse, l'activation des ACs ou l'augmentation de l'AMPC intracellulaire n'a pas d'effets sur la densité de synapses (**Figure 20**). En parallèle, j'ai testé l'effet d'une surexpression de l'AC1 ou de l'AC8 sur les synapses glutamatergiques. L'AC8 ne s'exprimait pas dans nos neurones alors que l'AC1 était détectée sous forme d'agrégats et de manière diffuse dans le neurone. Je n'ai pas observé d'effet significatif d'une expression de l'AC1 dans les neurones sur le nombre de synapses glutamatergiques. L'absence d'effet de la surexpression de l'AC1 peut être liée à des phénomènes de compensation mis en place les trois jours suivant la transfection des plasmides, pendant lesquels des phosphodiésterases peuvent dégrader l'AMPC et faire ainsi disparaître la régulation liée à cet AMPC (Bock et al., 2020). Il est possible de transférer un plasmide exprimant une AC photosensible, qui permettrait l'augmentation locale et transitoire d'AMPC et éviterait cette régulation éventuelle par les phosphodiésterases (Ohki et al., 2016). Pour voir si les ACs ont des effets sur les synapses glutamatergiques dépendants du A<sub>2A</sub>R neuronal, il serait possible de transférer un plasmide surexprimant l'AC1, présente au niveau des radeaux lipidiques, en parallèle du shA2A et d'activer les ACs avec de la forskoline. A défaut de voir des effets de l'activation de l'AC et/ou de la production d'AMPC sur la synaptogenèse glutamatergique, nous avons essayé à l'inverse de tamponner l'AMPC avec les constructions Lyn et Kras qui ciblent les éponges à AMPC au niveau des radeaux lipidiques ou en dehors. Aucune de ces constructions ne modifie le nombre de synapses dans des neurones sauvages ou n'a d'effet sur la perte synaptique induite par le shA2A (**Figure 21**). Il est à noter que ces traitements et ces constructions ont un effet sur la synaptogenèse GABAergique, ce qui valide leur efficacité dans notre modèle *in vitro* et suggère fortement que la voie AC/AMPC n'est pas impliquée dans la stabilisation des synapses glutamatergiques.

En dehors des radeaux lipidiques, le A<sub>2A</sub>R est couplé à la **voie MAPK** (Charalambous et al., 2008) et son activation induit l'élongation des axones. Il est possible de tester la contribution de cette voie avec des inhibiteurs pharmacologiques comme U0126, LY294002 et U73122, ciblant respectivement MEK/Erk, PI3K et PLC (Ribeiro et al., 2016) en présence ou non du shA2A, ou de l'agoniste du A<sub>2A</sub>R en combinaison avec ADA+AMPCP. L'interaction du A<sub>2A</sub>R avec le **FGFR** a été montrée. Il serait intéressant d'étudier les effets synergiques de

l'activation du A<sub>2A</sub>R et du FGFR sur la voie MAPK en présence de faibles concentrations d'adénosine (ADA+AMPCP) (Flajolet et al., 2008) et ses conséquences sur les synapses glutamatergiques. Nos expériences préliminaires ne montrent pas de lien direct entre le A<sub>2A</sub>R et la voie MAPK ou le FGFR.

### **Si les voies de signalisation canoniques liées à A<sub>2A</sub>R ne sont pas impliquées dans la stabilisation de synapses glutamatergiques, quel serait alors le mécanisme d'action du A<sub>2A</sub>R neuronal ?**

Les données présentées dans ce manuscrit suggèrent qu'en dehors des voies de signalisation canonique, la **présence physique du A<sub>2A</sub>R neuronal serait nécessaire pour stabiliser les synapses glutamatergiques**. En effet, en absence de A<sub>2A</sub>R neuronal, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs par l'agoniste n'induit pas de perte supplémentaire de synapses (**Figure 19**). Notre hypothèse est donc que le A<sub>2A</sub>R interagirait avec une protéine au niveau de la synapse excitatrice et favoriserait la stabilité de cette dernière. De plus, la surexpression du A<sub>2A</sub>R neuronal n'affecte pas la densité de synapses ce qui correspondrait à un rôle stabilisateur des synapses glutamatergiques (**Figure 18**). Notre hypothèse est donc que le A<sub>2A</sub>R interagirait avec une ou plusieurs protéines au niveau de la synapse excitatrice qui régulerait la stabilisation ou la déstabilisation de la synapse. Cependant, avant de se pencher sur les interactions physiques entre le A<sub>2A</sub>R et des effecteurs moléculaires, il est important de noter que la modification de l'expression des A<sub>2A</sub>Rs dans un type cellulaire peut entraîner des **phénomènes d'adaptation ou de plasticité**. La délétion du A<sub>2A</sub>R astrocytaire induit des modifications de la transmission glutamatergique en augmentant l'expression des NMDARs contenant des sous-unités NR2B et en favorisant l'internalisation des récepteurs AMPA. Ces adaptations neuronales sont à l'origine de déficits cognitifs (Matos et al., 2015). Par exemple, on peut émettre l'hypothèse que la délétion du A<sub>2A</sub>R neuronal entraînerait l'augmentation de l'expression des A<sub>1</sub>Rs ou des A<sub>2B</sub>Rs. (Moriyama and Sitkovsky, 2010). Il serait intéressant d'évaluer l'impact de la transfection du shA2A sur l'expression des autres récepteurs à l'adénosine au sein du neurone transfecté et des neurones environnants, pour comprendre si des mécanismes d'adaptation seraient en cause dans les effets du shA2A observés.

De manière intéressante, le blocage du A<sub>2A</sub>R au cours de la synaptogenèse induit un enrichissement de gènes de la **région postsynaptique** (Miao et al., 2021). Les mécanismes de stabilisation des synapses par le A<sub>2A</sub>R impliqueraient donc ce compartiment. Les **AMPARs et NMDARs** sont essentiels pour le maintien des synapses en développement (Zou and Cline, 1999; Cohen-Cory, 2002; Kesner et al., 2020). **La sous-unité GluA1** peut participer à la formation de synapses. Le glypican 4 (GPC4) sécrété par les astrocytes de manière importante au cours du développement, induit la formation des synapses excitatrices en

augmentant les niveaux de récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA1 (Kamimura and Maeda, 2021).

Nos expériences révèlent également des changements dans la diffusion et l'accumulation postsynaptique de GluA1 mais pas de NR1 en réponse à l'activation ou au blocage du A<sub>2A</sub>R. Dans nos cultures hippocampiques mixtes, l'activation du A<sub>2A</sub>R par le CGS-21680 en absence d'adénosine extracellulaire induit une perte de synapses glutamatergiques (**Figure 8**). L'analyse en immunocytochimie des sous-unités GluA1 et NR1 montre que l'activation du A<sub>2A</sub>R induit une perte de GluA1 aux synapses glutamatergiques mais pas de NR1 (**Figure 13**). En suivi de molécule unique, **l'activation du A<sub>2A</sub>R favorise la diffusion latérale de GluA1 aux synapses excitatrices (Figure 12)**. Cela pourrait correspondre à une **déstabilisation de la synapse**. Ces résultats sont en accord avec ceux montrant qu'aux synapses inactives, GluA1 est très mobile et les AMPARs diffusent hors de la synapse (Ehlers et al., 2007).

La mobilité des sous-unités GluA1 des AMPARs participe à plusieurs formes de potentiation des synapses glutamatergiques. Il a été montré que **l'activation des A<sub>2A</sub>Rs peut induire la phosphorylation des GluA1 par la PKA** et favoriser les processus de LTP. Dans ce cas, les concentrations en adénosine extracellulaire sont importantes (Dias et al., 2012). Dans ces conditions, l'activation des A<sub>2A</sub>Rs favoriserait donc l'activité des AMPARs et stabiliserait ainsi les synapses, mais cela est différent de nos observations dans les cultures mixtes où les concentrations d'adénosine sont réduites. Cela peut être dû à l'âge des neurones (i.e. un effet sur la formation des synapses ou un effet sur la plasticité des synapses matures), aux différents types cellulaires présents et à leurs effets opposés sur les synapses (neurones ou microglie) et leurs réponses aux concentrations d'adénosine (faibles ou élevées) (Di Angelantonio et al., 2015) ou encore à des phénomènes d'internalisation des AMPARs.

Il serait intéressant de regarder si les **récepteurs AMPA sont internalisés** en présence du CGS-21680 ou du SCH-58261, qui confine les AMPARs aux synapses (**Figure 12**). La localisation des AMPARs peut modifier la formation ou plasticité des synapses. L'internalisation des AMPARs médiée par l'activation des NMDARs est suivie d'une réinsertion à la membrane. Les NMDARs contrôlent les mouvements des AMPARs via la PKA, et sont associés à la déphosphorylation puis rephosphorylation de GluA1 (Ehlers, 2000). Si le recrutement des AMPARs suite à l'activation des NMDARs et l'entrée de calcium est décrit au cours d'une LTP et pourrait dépendre des synaptotagmines 1 et 7, qui lient le calcium, (Wu et al., 2017), au cours d'une LTD, les AMPARs contenant GluA2 sont internalisés et ce phénomène dépend de la synaptotagmine 3 (Syt3) (Awasthi et al., 2019). On peut donc se demander si les récepteurs AMPA seraient endocytés après activation ou blocage de la voie A<sub>2A</sub> et quelles seraient les conséquences physiologiques sur la stabilisation de la synapse.



De plus, les phénomènes de LTP induisent un élargissement des épines dendritiques qui peut être lié à la quantité d'AMPARs présents au niveau postsynaptique (Matsuzaki et al., 2004).

Les modulations pharmacologiques de la signalisation adénoenergique n'ont pas d'effets sur la sous-unité NR1 des NMDARs (**Figure 13**). Une autre sous-unité des NMDARs pourrait être étudiée, la **NR2B**. Elle est impliquée dans les processus de mémoire et participerait à l'internalisation des AMPARs (Sanz-Clemente et al., 2013; Matos et al., 2015). Cette sous-unité, prédominante au cours du développement, permet aussi la formation des synapses, en se liant à la CamKII. (Gambrill and Barria, 2011).

Il est aussi important de noter que les marqueurs postsynaptiques **PSD-95** et **SAP-102** sont impliqués dans la stabilisation des synapses naissantes. SAP-102 n'est pas régulé de la même façon que PSD-95, elle est plus mobile dans les épines dendritiques, mais ces protéines d'échafaudage sont modulées par le cytosquelette d'actine (Al-Hallaq et al., 2007). Le  $A_{2A}R$  se lie à l' **$\alpha$ -actinine-1**, elle-même associée à la PSD des synapses glutamatergiques, avec les récepteurs métabotropiques au glutamate 5, NMDA et P2X7 (Cabello et al., 2007). L'interaction du  $A_{2A}R$  avec l' $\alpha$ -actinine-1 module l'expression du  $A_{2A}R$  à la membrane, et l'association **NMDAR/mGluR5** pourrait faciliter la modulation des courants médiés par les NMDARs par mGluR5 et la stabilité de la synapse. Il reste cependant à savoir si cette interaction contrôle la stabilisation des synapses glutamatergiques naissantes.

Comme mentionné en introduction, les **CAMs** peuvent réguler la formation des synapses (Chen et al., 2010), leur plasticité et leur élimination. Leurs interactions sont variées et dépendent de leur localisation (Basu et al., 2017). Le  $A_{2A}R$  neuronal pourrait moduler les dynamiques de ces interactions et stabiliser ou non les synapses naissantes par ce biais.

**Le  $A_{2A}R$  interagit avec plusieurs protéines et peut moduler leur activité. Comment par une interaction physique le  $A_{2A}R$  neuronal maintiendrait-il un état stable de la synapse ?**

Nous pouvons faire l'hypothèse que le  $A_{2A}R$  serait couplé à une protéine membranaire et inhiberait son rôle déstabilisateur/inhibiteur de l'activité ou activerait son rôle stabilisateur. Quels sont les candidats potentiels ?

Le  **$A_{2A}R$  peut s'hétérodimériser avec le  $A_1R$** , qui limite la neurotransmission glutamatergique, et inhibe sa fonction. Cependant, cette interaction n'a pas été montrée au niveau péri ou postsynaptique, et le rôle du  $A_1R$  au cours du développement ou son implication dans la synaptogenèse ou stabilisation de synapses n'ont pas été montrés.

Le **récepteur  $A_2B$  peut se dimériser avec les  $A_{2A}Rs$** , mais il est compliqué de déterminer leur contribution dans les effets observés sur les synapses glutamatergiques car leur affinité

pour l'adénosine est faible. C'est pourquoi le rôle des A<sub>2B</sub>R dans le SNC, où ils sont relativement peu exprimés, pourrait plutôt moduler des phénomènes d'inflammation en association avec les A<sub>2A</sub>Rs. L'expression du A<sub>2A</sub>R favoriserait l'expression du A<sub>2B</sub>R à la membrane (Moriyama and Sitkovsky, 2010), ce qui serait cohérent dans ces contextes inflammatoires, mais la piste d'une coopération au niveau des synapses au cours du développement reste à explorer, sachant que les A<sub>2A</sub>Rs et A<sub>2B</sub>Rs favorisent tous deux la transmission glutamatergique.

**L'activation des A<sub>2A</sub>Rs associés avec les CB1Rs** bloquerait leurs effets inhibiteurs sur la transmission excitatrice et l'excitabilité postsynaptique, médiés par les mGluR5 et NMDAR dans l'hippocampe (Kouvaros and Papatheodoropoulos, 2016). L'interaction des A<sub>2A</sub>Rs et des CB1R au niveau pérисynaptique des synapses glutamatergiques de l'hippocampe au cours du développement reste à déterminer.

**Le A<sub>2A</sub>R transactive le TrkB.** Le blocage du TrkB induit une perte de synapses GABAergiques, et dans ces conditions, l'activation du A<sub>2A</sub>R restaure le nombre de synapses (Gomez-Castro et al., 2021). L'activation du A<sub>2A</sub>R induit aussi une augmentation de BDNF (Jeon et al., 2011), ce qui stabilise PSD-95 et favorise la croissance des dendrites via les microtubules (Hu et al., 2011). Dans ces expériences, le CGS est utilisé seul et les résultats correspondent donc les observations faites dans les cultures hippocampiques car l'activation du A<sub>2A</sub>R ne modifie pas la densité de PSD-95 aux synapses (**Figure 8**).

Les A<sub>2A</sub>Rs interagissent avec les **mGluR5**. Ils auraient un rôle permissif sur l'activité des mGluR5 pour potentialiser les NMDARs, via la phosphorylation de NR2B (Temido-Ferreira et al., 2020). mGluR5 interagit avec la Norbin et Homer, qui augmentent l'adressage à la surface cellulaire de mGluR5 et régule positivement la signalisation associée (Brakeman et al., 1997; Wang et al., 2009).

Nous ne pouvons pas conclure quant à l'implication des molécules citées ci-dessus dans la stabilisation des synapses médiée par le A<sub>2A</sub>R.

### **Quelle est la contribution du A<sub>2A</sub>R neuronal et non-neuronal *in vivo* ?**

**Pour comprendre le rôle du A<sub>2A</sub>R neuronal** à l'échelle d'un réseau de neurones intégré et au cours de la période de synaptogenèse, des souris CamkII $\alpha$ -CreERT2 sont actuellement croisées avec des souris d'une lignée A2A-Flox. L'injection de tamoxifène au cours de la période de synaptogenèse (entre P3 et P16) permettra de supprimer l'expression du A<sub>2A</sub>R spécifiquement dans les neurones et d'observer les effets sur les synapses glutamatergiques, la mise en place des réseaux neuronaux et les comportements.

Même si les effets observés dans les cultures primaires en présence de composés pharmacologiques correspondent à des mécanismes de stabilisation, l'expérience de transfection du shA2A pourrait impacter la synaptogenèse. Il serait intéressant de visualiser l'effet d'une délétion conditionnelle du A<sub>2A</sub>R neuronal sur la formation de synapses excitatrices naissantes. Pour cela, une technique a été mise au point, **appelée GRASP (GFP reconstitution across synaptic partners)**. Elle est basée sur l'expression de deux fragments de GFP non fluorescents au niveau de membranes synaptiques qui sont exprimés dans des neurones distincts. Lorsque les membranes synaptiques de deux neurones sont apposées, la fluorescence de la GFP est rétablie et la synapse naissante peut être visualisée (Kim et al., 2012; Choi et al., 2018). En utilisant les **souris CamKII $\alpha$ <sup>Cre/+</sup> :: A2A<sup>flox/flox</sup>** pour supprimer le A<sub>2A</sub>R neuronal au moment de la synaptogenèse et la technique GRASP, nous pourrions étudier le rôle du A<sub>2A</sub>R neuronal dans la **formation des synapses naissantes**.

**Le récepteur A2A est aussi exprimé par d'autres types cellulaires dans le cerveau.** Dans les cultures de neurones hippocampiques, l'analyse d'immunocytochimies a révélé que les A<sub>2A</sub>Rs étaient présents sous forme d'agrégats dans les **prolongements astrocytaires**, et que leur expression était maximale à DIV7 (**Figure 6**). L'analyse ultrastructurale du A<sub>2A</sub>R à P7 ou P30 a révélé que le récepteur était localisé le long de la membrane plasmique des astrocytes (**Figure 5**). Les A<sub>2A</sub>Rs étaient exprimés de manière diffuse dans les microglies dans les cultures *in vitro* et l'intensité d'expression diminuait après DIV7 (**Figure 7**). Ces localisations subcellulaires du A<sub>2A</sub>R au cours de la synaptogenèse suggèrent une implication du récepteur dans les cellules neuronales et non-neuronales.

Les effets médiés par le A<sub>2A</sub>R seraient en fait différents en fonction du type cellulaire l'exprimant. Dans les cultures hippocampiques composées de cellules neuronales et gliales, l'activation du A<sub>2A</sub>R induit une perte de synapses glutamatergiques (**Figure 8**), et ces effets sont bloqués en absence de cellules gliales (**Figure 14**) ou microgliales (**Figure 15**). L'hypothèse est que les **récepteurs A2A gliaux et neuronaux auraient des fonctions opposées** sur les synapses glutamatergiques. Il a déjà été montré que les A<sub>2A</sub>Rs neuronaux et astrocytaires ont des effets neuromodulateurs opposés sur la mémoire. La suppression de l'activité des A<sub>2A</sub>R neuronaux a des effets neuroprotecteurs tandis que la délétion des récepteurs A2A astrocytaires potentialise l'apparition de déficits de mémoire (Matos et al., 2015).

Les cellules gliales participeraient donc à la régulation médiée par le A<sub>2A</sub>R neuronal. Au vu des résultats obtenus, nous pourrions proposer que les astrocytes seraient impliqués dans la régulation des synapses médiée par les A<sub>2A</sub>Rs neuronaux, en lien avec la densité importante de ces cellules dans la culture et leurs nombreux rôles à la synapse. Une autre hypothèse attrayante est que les neurones et les microglies interagiraient par des contacts directs ou des

échanges membranaires, ce qui permettrait une régulation rapide de la synapse glutamatergique. Nous nous sommes d'abord intéressés à cette hypothèse neuro-microgliale dans le cadre de cette thèse, en gardant en mémoire le rôle potentiel des astrocytes dans les mécanismes observés.

## **2. Interactions possibles entre neurone et microglies à l'origine de la stabilisation ou déstabilisation des synapses glutamatergiques**

La régulation des synapses par les neurones et microglies peut impliquer une interaction physique ou la libération de facteurs solubles. La perte de synapses glutamatergiques médiée par l'activation du A<sub>2A</sub>R dans la culture mixte (**Figure 8**), bloquée en absence de microglies (**Figure 15**), peut dépendre de l'activation des récepteurs A<sub>2A</sub> microgliaux, de la présence des microglies et de l'interaction de la synapse avec des protéines microgliales.

**Pour explorer la contribution des A<sub>2A</sub>Rs microgliaux** dans la régulation des synapses glutamatergiques, des techniques de purification de microglies et RT-qPCR ont permis de montrer une très faible expression d'*Adora2a* dans la microglie pendant la synaptogenèse à P10 ou P30 (**Figure 24**). L'expression protéique peut néanmoins être observée en présence d'un taux faible de transcrits. C'est pourquoi nous avons déterminé par immunohistochimie la localisation de la protéine A<sub>2A</sub> dans les microglies. Les données préliminaires obtenues montrent un faible marquage du A<sub>2A</sub>R dans les microglies à P10, P16 ou P30 (**Figure 25**). Ces expériences sont à poursuivre pour pouvoir quantifier plus précisément l'expression protéique des A<sub>2A</sub>Rs dans les microglies. Pour le moment, ces données suggèrent que les A<sub>2A</sub>Rs microgliaux seraient peu impliqués dans la régulation de la densité des synapses glutamatergiques. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant des souris **CX3CR1<sup>Cre/+</sup> ::A2A<sup>flox/flox</sup>**, actuellement en croisement, injectées avec du tamoxifène au cours de la période de synaptogenèse pour supprimer spécifiquement le A<sub>2A</sub>R dans les microglies à cette période. Une telle manipulation de l'expression développementale du A<sub>2A</sub>R dans les microglies n'a jamais été décrite, ce qui rend la perspective de ce modèle très intéressante. L'analyse des synapses glutamatergiques, de la mise en place et de l'activité des réseaux neuronaux et de comportements permettra de caractériser ce modèle et de mieux comprendre le rôle des A<sub>2A</sub>Rs microgliaux au cours de la synaptogenèse.

D'autres modèles sont possibles pour étudier les contributions respectives des A<sub>2A</sub>Rs neuronaux et microgliaux *in vitro* sur la stabilisation des synapses excitatrices. En utilisant des souris KO-A<sub>2A</sub>R (KO) ou wild-type (WT), des **co-cultures** de cellules de l'hippocampe pourraient être préparées, en mettant en contact des neurones KO avec des microglies WT, ou des neurones WT avec des microglies KO. L'analyse de la densité des synapses

glutamatergiques et de l'expression des  $A_{2A}R$ s dans les deux types cellulaires permettra d'éclairer la contribution de chacun dans la régulation des synapses.

Une autre piste intéressante serait d'activer des microglies avec des LPS et d'induire ainsi une augmentation de la réactivité des  $A_{2A}R$ s microgliaux (Orr et al., 2009). Ces microglies activées seraient mises en contact dans un système de co-culture avec des neurones WT, et la densité de synapses glutamatergiques serait analysée, ainsi que les effets sur l'expression, la localisation des  $A_{2A}R$ s neuronaux, la production de facteurs synaptotrophiques ou toxiques par les microglies.

**Une hypothèse serait que la synapse en contact avec la microglie lui communiquerait des signaux de stabilisation ou déstabilisation par le  $A_{2A}R$  neuronal.**

La présence du  $A_{2A}R$  neuronal et son interaction avec une protéine reconnue par la microglie informerait la microglie de manière activité-dépendante que cette synapse doit être éliminée, ou à l'inverse modulerait son recrutement afin de stabiliser la synapse. Dans les cultures hippocampiques, la perte de synapses glutamatergiques médiée par l'activation du  $A_{2A}R$  est bloquée en présence d'un anticorps neutralisant la protéine C1q (**Figure 22**). Il a été montré que l'injection de l'anticorps bloquant C1q réduit la phagocytose des synapses par les microglies *in vivo* et augmente la densité des synapses quelques jours après l'injection (Dejanovic et al., 2018). **Le  $A_{2A}R$  neuronal pourrait donc interagir avec un effecteur de la voie du complément**, comme C1q, C3 ou C5. Ces interactions pourraient être testées en utilisant des anticorps neutralisant C3 ou C5 dans des conditions où le  $A_{2A}R$  est activé, ou en absence du  $A_{2A}R$  dans les neurones transfectés avec le shA2A. En lien avec C1q, les  $A_{2A}R$ s à la synapses pourraient aussi être associés à la phosphatidylsérine qui est exprimée aux synapses, colocalisée avec C1q et marque les synapses qui seront éliminées (Scott-Hewitt et al., 2020). Dans ce cas l'interaction du  $A_{2A}R$  neuronal avec les protéines du complément ou la PS inhiberait les messages « eat-me ». Sachant que la protéine C1q est présente sous forme soluble à la membrane des neurones et donc diffuse, l'association du  $A_{2A}R$  neuronal avec C1q permettrait d'identifier les synapses à éliminer en préservant les synapses environnantes du même neurone.

**Le  $A_{2A}R$  neuronal pourrait aussi interagir avec les pentraxines neuronales** qui sont sécrétées au niveau des synapses et interagissent avec C1q, via leur domaine C-terminal (Kovács et al., 2021). Les NPs ont été impliquées dans le raffinement des circuits synaptiques, où elles marqueraient les synapses à dégrader. En l'absence de NP1/2, la densité des synapses dans le dLGN est accrue au cours du développement, et cet effet est similaire à celui des KO pour C1q (Bjartmar et al., 2006).

**Une interaction du A<sub>2A</sub>R avec un récepteur membranaire TREM2**, une protéine microgliale qui reconnaît la PS et est nécessaire pour la phagocytose durant la synaptogenèse, est également envisageable. Est-ce que le A<sub>2A</sub>R reconnaît la PS qui est exprimée sur le neurone?

L'interaction de A<sub>2A</sub>R avec CD47 n'a pas été montrée mais **CD47 protège de l'élimination des synapses par les microglies**. Ce signal « don't eat-me » est présent préférentiellement aux synapses actives (Lehrman et al., 2018), et on pourrait émettre l'hypothèse que le A<sub>2A</sub>R neuronal serait associé à type de signaux pour limiter la déstabilisation et l'élimination des synapses glutamatergiques (Elward, 2003).

### **Le A<sub>2A</sub>R a-t-il un rôle dans la régulation du phénotype microglial ?**

Les signalisations purinergiques sont impliqués dans les **dérégulations synaptiques** induites dans des contextes allostatiques. Dans un modèle de tauopathie, l'expression accrue de A<sub>2A</sub>R induit une perte des synapses dans l'hippocampe et des déficits mnésiques (Carvalho et al., 2019). L'activation des microglies médiée par les récepteurs purinergiques P2X7 participe à l'altération de la plasticité dans les tauopathies. Dans ces conditions, l'inhibition des A<sub>2A</sub>Rs ou des P2X7R a un effet neuroprotecteur (Carvalho et al., 2021). Les A<sub>2A</sub>Rs contrôlent l'activation des microglies et les **processus de neuroinflammation** et ils agiraient en **coopérant** avec les P2X7R (Dias et al., 2021), qui sont décrits pour leur rôle dans l'inflammation (Di Virgilio et al., 2017).

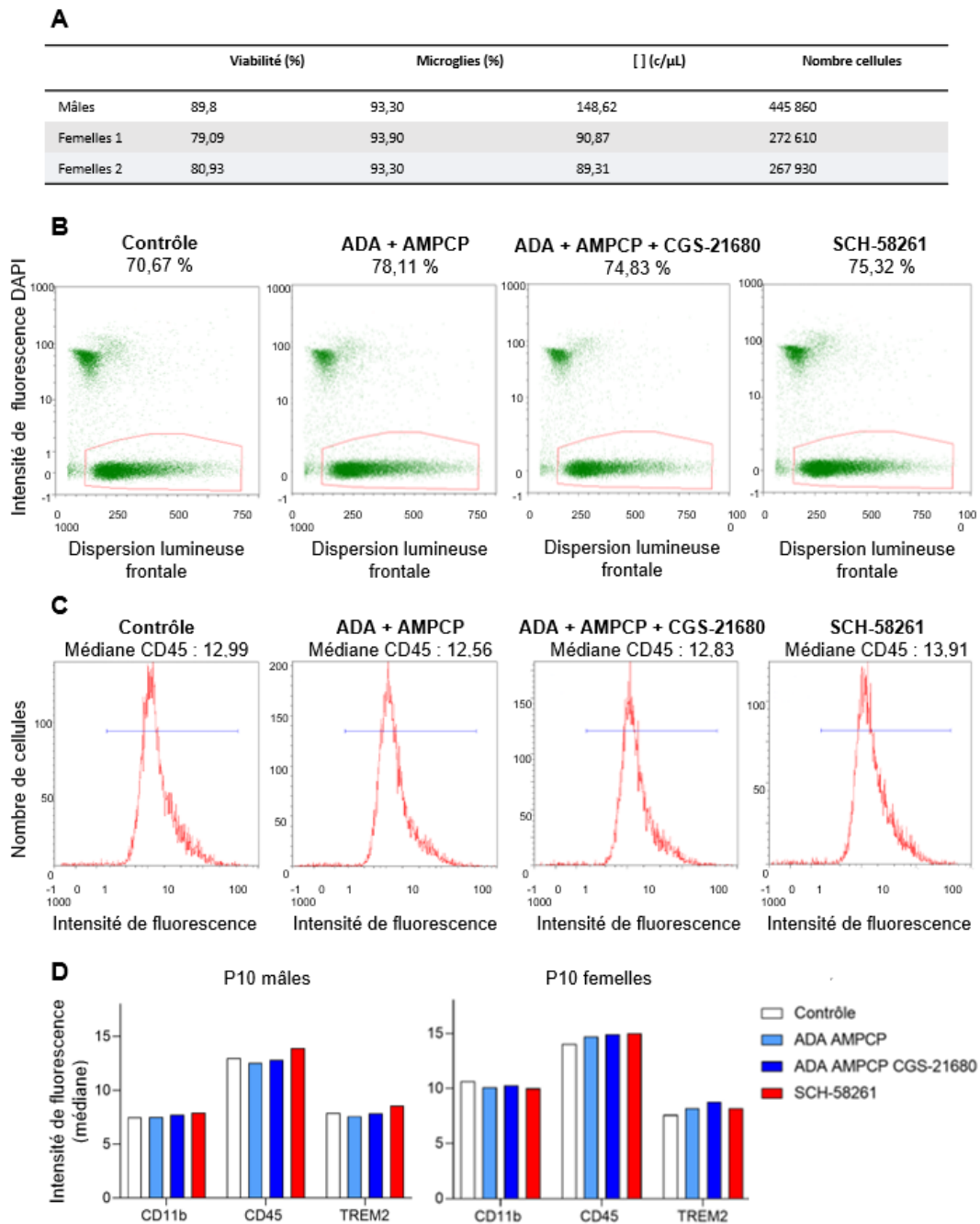
Une hypothèse est que le A<sub>2A</sub>R modulerait l'activation ou les capacités phagocytaires des microglies. En effet, le **blocage pharmacologique du A<sub>2A</sub>R au cours du développement modifie la morphologie des microglies** (Simões-Henriques et al., 2020) et induit l'augmentation de l'activité lysosomale et phagocytaire des microglies dans le dLGN (Miao et al., 2021).

**Pour étudier l'activation des microglies médiée par le blocage des A<sub>2A</sub>Rs** au cours de la synaptogenèse, nous pourrions analyser l'expression de CD68 dans les microglies en marquant par immunohistochimie Iba1 et CD68 et en quantifiant les aires de CD68 dans les microglies Iba1-positives (Cope et al., 2016), qui augmenterait en cas d'activation. Les données acquises sur la capacité phagocytaire de matériel synaptique par les microglies (Figure 26) ne nous donnent pas accès à cette information.

Il pourrait aussi être intéressant de regarder la **phagocytose des synapses excitatrices** dans les microglies (Figure 26) **au cours de la synaptogenèse** (P10) et non après (P21), pour voir s'il y aurait un décalage dans le phénomène d'élagage synaptique (Paolicelli et al., 2011).

Nous avons également testé la contribution de la signalisation du A<sub>2A</sub>R sur une durée réduite (1h) sur l'activation des microglies purifiées. En parallèle de l'étude de l'expression du A<sub>2A</sub>R

par les microglies au cours de la synaptogenèse en collaboration avec Solen Rimbart, nous nous sommes intéressées à 3 marqueurs membranaires d'homéostasie, ou d'activation des microglies, **CD11b, CD45 et TREM2** (Figure 27). Pour tester les effets d'un blocage ou de l'activation des  $A_{2A}$ Rs sur ces marqueurs, les microglies ont été purifiées à P10, à un taux correct (>90%), en quantité suffisante (environ 500 000 cellules en moyenne) (Figure 27A) et exposées ou non au SCH, ADA+AMPCP ou ADA+AMPCP+CGS pendant 1 heure à 37°C. Après les traitements, les suspensions cellulaires ont été analysées en cytométrie de flux. Les cellules apoptotiques ont été retirées de l'analyse (Figure 27B, diffusion lumineuse frontale  $\geq 200$ ), et le taux de survie des cellules est resté stable avec les différents traitements (>70%). L'intensité de fluorescence de CD11b, CD45 et TREM2 a été déterminée sur les cellules vivantes analysées, et sa médiane correspond au taux d'expression membranaire de ces protéines. Les valeurs sont stables dans les différentes conditions pour les 3 marqueurs d'activation microgliale et pour les deux sexes (Figure 27C). Il semble tout de même y avoir un phénotype microglial sexe-dépendant car les intensités de fluorescence sont généralement plus élevées dans les cellules issues de femelles. Dans nos conditions expérimentales, ces résultats préliminaires suggèrent que **l'activation ou le blocage des  $A_{2A}$ Rs ne modulent pas l'expression membranaire des marqueurs microgliaux d'activation et de phagocytose.**



**Figure 27 : Le blocage ou l'activation des  $A_{2A}$ Rs microgliaux pendant la synaptogenèse n'augmente pas l'immunoréactivité membranaire des marqueurs d'activation des microglies.** (A) Taux de viabilité et de purification des microglies obtenues à partir de souris mâles (n=3) et femelles (n=4 divisé en 2 groupes équivalents) à P10. (B) Cytogrammes montrant pour chaque cellule (points verts) l'intensité de fluorescence du DAPI en fonction de leur taille, déterminée par FSC (dispersion lumineuse frontale) permettant de sélectionner uniquement les cellules vivantes (cercle rouge) pour les analyses. Le pourcentage de cellules vivantes est indiqué au-dessus de chaque condition. Les cellules ont été exposées aux traitements contrôle, ADA (2U/mL) + AMPCP (85μM) ou ADA + ABM + CGS (30nM), SCH58261 100nM). (C) Histogrammes représentant pour chaque traitement le nombre de cellules CD11b<sup>+</sup> sélectionnées en fonction de l'intensité de fluorescence de CD45. La médiane d'intensité de CD45 est calculée sur la population cellulaire délimitée par la droite horizontale bleue



indiquée pour chaque condition. (D) Histogramme des médianes d'intensité des marqueurs d'activation microgliaux CD11b, CD45 et TREM2 définis en (C), en fonction des différents traitements indiqués chez les mâles (gauche) ou les femelles (droite) à P10. N=1.

L'absence d'un contrôle positif constitue une limite de cette analyse des marqueurs d'activation, qui pourrait être contournée en activant les microglies avec les LPS, décrits pour induire un état pro-inflammatoire (Gomez-Castro et al., 2021). Une autre limite à cette technique est l'activation possible des microglies lors de l'étape de dissociation des tissus (Voir méthodes), qui biaiserait les résultats dus aux traitements avec les agonistes ou antagonistes du  $A_{2A}R$ . Nous n'avons cependant pas observé d'augmentation des marqueurs d'activation, il est donc possible que le temps de traitement d'1 heure soit trop court pour activer les microglies et augmenter l'expression ou induire la redistribution des marqueurs étudiés. Dans ce cas, le temps d'incubation pourrait être rallongé, avec néanmoins un risque pour la survie des microglies purifiées.

Pour lier les résultats sur les synapses glutamatergiques (**Figure 23**), les capacités phagocytaires des microglies (**Figure 26**) et l'activation des microglies, les purifications de microglies pourraient être réalisées sur des animaux injectés avec le SCH-58261 ou la caféine au cours de la synaptogenèse selon le protocole utilisé en **Figure 23A**, et les marqueurs d'activation testés dans une expérience de cytométrie de flux. Nous nous attendrions à ce que le **marqueur phagocytaire TREM2** augmente dans les conditions SCH ou caféine par rapport au contrôle, ce qui serait cohérent avec l'augmentation de l'activité phagocytaire des microglies dans le dLGN lorsque le  $A_{2A}R$  est bloqué spécifiquement au cours de la synaptogenèse (P2 et P4 dans cette région du SNC) (Miao et al., 2021). Si le blocage du  $A_{2A}R$  neuronal favorise l'activation des microglies au cours du développement, cette activation pourrait favoriser la formation des synapses au stade adulte (Cristovão et al., 2014).

Même si la signalisation adénosinergique via les récepteurs  $A_{2A}Rs$  microgliaux serait minime dans les processus de stabilisation des synapses excitatrices, l'adénosine pourrait activer les **récepteurs A3 sur la microglie (Figure 24)**. L'extension des prolongements microgliaux et la migration subséquente des microglies médiée par l'ADP est régulée par les  $A_3R$  (Ohsawa et al., 2012). L'activation des microglies induit une diminution de l'expression de  $A_3R$  par les microglies en parallèle de l'augmentation de l'expression des  $A_{2A}Rs$ . Dans les microglies non activées, la signalisation médiée par le  $A_3R$  serait prévalente. En cas d'activation des microglies, la diminution de la signalisation des  $A_3Rs$  permettrait l'expression des signaux anti-inflammatoires médiés par les  $A_{2A}Rs$  (van der Putten et al., 2009).

De plus, les effets observés sont d'autant plus complexes qu'ils sont région-spécifiques. Un Les microglies seraient différentes en fonction des régions de l'hippocampe, entre CA1 et CA3

par exemple. Différentes fonctions des A<sub>2A</sub>Rs ont été décrits dans des régions différentes (Shen et al., 2008; Yu et al., 2008). De plus, les mêmes molécules synaptiques pourraient interagir différemment en fonction des régions du SNC.

Des modifications des microglies pourraient donc impacter leur capacité à éliminer des synapses, par phagocytose ou par trogocytose (voir partie 1.3.1.2).

La libération de différents facteurs par les microglies pourrait aussi être modulée par la signalisation adénoenergique. Par exemple, les microglies pourraient libérer plus ou moins de **glutamate** à proximité des synapses et ainsi modifier l'activité neuronale (Miyamoto et al., 2013). La quantité de **micro-vésicules** libérées par les microglies, qui augmente les mEPSCs (Antonucci et al., 2012), pourrait aussi être modifiée par la signalisation adénoenergique. La **libération de TNF- $\alpha$**  module les récepteurs glutamatergiques et participe à la plasticité des synapses (Beattie et al., 2002; Béchade et al., 2013). L'activation des A<sub>2A</sub>Rs bloque la production de TNF- $\alpha$  par les microglies activées (Newell et al., 2015; Liu et al., 2017). La libération de **thrombospondines** par les microglies peut aussi être modifiée, ce qui affecterait la synaptogenèse, en limitant l'assemblage de molécules à la synapse au cours du développement (Christopherson et al., 2005).

### **3. Rôle de l'adénosine extracellulaire et de l'activité**

Dans ces expériences de thèse plusieurs limites pharmacologiques peuvent être citées.

Le récepteur A<sub>1</sub> est aussi exprimé dans l'hippocampe (Cunha, 2016) et il a été montré que le **CGS-21680 peut se lier au A<sub>1</sub>R** spécifiquement dans cette région (Halldner et al., 2004). Il est donc intéressant de se demander si les effets du CGS-21680 observés sur les synapses excitatrices (Figure 8) sont médiés par les A<sub>1</sub>Rs ou les A<sub>2A</sub>Rs. Le blocage du A<sub>1</sub>R ou son activation n'ont pas d'effet sur la densité de synapses excitatrices dans les cultures hippocampiques (Figure 11). La régulation de la densité des synapses glutamatergiques observée *in vitro* est donc bien médiée par le A<sub>2A</sub>R. En revanche, un contrôle supplémentaire serait intéressant à faire en comparant l'activation du A<sub>2A</sub>R par le CGS-21680 en présence ou absence d'un antagoniste du A<sub>1</sub>R (DPCPX).

Il a aussi été montré que **l'inosine**, issue de la dégradation de l'adénosine par l'ADA, **peut agir sur le A<sub>1</sub>R et le A<sub>2A</sub>R**. L'adénosine a un temps de demi-vie de 10 secondes et l'inosine de 15 heures, avec des concentrations élevées allant jusqu'à 30 $\mu$ M. L'inosine inhibe la liaison du CGS-21680 sur le A<sub>2A</sub>R et est un agoniste fonctionnel des A<sub>2A</sub>Rs (Welihinda et al., 2016). L'inosine se fixe aussi sur les A<sub>1</sub>Rs avec une forte affinité (Nascimento et al., 2015).

## Quelle est la source d'adénosine ?

L'adénosine détectée au niveau péri et postsynaptique par les  $A_{2A}Rs$  provient de sa libération directe au niveau présynaptique, et de l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire par CD73 (Cunha, 2001a; Klyuch et al., 2012; Wall and Dale, 2013; Dale, 2021). Dans le modèle *in vitro* présenté dans ce manuscrit, les effets de l'agoniste du  $A_{2A}R$  sont visibles uniquement lorsque les **taux d'adénosine ambiant ont été réduits en présence d'ADA et d'AMPCP**. Cela suggère que dans des conditions basales, les récepteurs  $A_{2A}$  sont largement occupés par l'adénosine extracellulaire. Les effets observés dans des conditions d'adénosine extracellulaire réduite pourraient être liés à l'activation **d'autres récepteurs purinergiques**, et notamment les récepteurs à l'ATP, qui médient des interactions neurogliales. Il serait donc important de vérifier si les effets observés dans les cultures hippocampiques ne sont pas liés à l'activation de ces récepteurs, et de voir quels effets indépendants de l'activité sont visibles dans le modèle, en présence de TTX.

## La stabilisation des synapses glutamatergiques par le $A_{2A}R$ est activité-dépendante.

Le rôle du  $A_{2A}R$  dans l'élimination des synapses dépend de l'activité neuronale (Miao et al., 2021), ce qui est cohérent avec la **production accrue d'ATP**, d'adénosine et de l'augmentation de l'expression de CD73 dans les synapses hippocampiques pendant la période de synaptogenèse (Gomez-Castro et al., 2021). Une communication neurogliale liée à l'activité a aussi été montrée dans les cellules de Schwann qui ont un rôle dans la myélinisation au cours du développement, qui coïncide avec une production accrue d'ATP (Stevens et al., 2002). Bloquer les  $A_{2A}Rs$  impacte l'activité des neurones et pourrait aussi affecter l'activité des microglies.

Dans les processus décrits précédemment, la clef de voûte est **l'activité neuronale**. Elle permet le recrutement des microglies et des astrocytes à la synapse active, libérant de l'ATP qui pourra être dégradé en adénosine et médier les régulations de stabilisation synaptiques via les  $A_{2A}Rs$  selon nos hypothèses. Les astrocytes peuvent aussi participer à régulation en sécrétant des facteurs ou gliotransmetteurs favorisant l'activité et la stabilité des synapses (voir partie 1.3.1.5).

Comme à la synapse GABAergique, il existerait donc un mécanisme de détection de l'activité synaptique, codée par la libération d'ATP/adénosine dans la fente synaptique, par les  $A_{2A}Rs$  pérисynaptiques, et un mécanisme pour déstabiliser/éliminer la synapse si la signalisation n'est pas activée, impliquant des interactions entre le neurone et les microglies (Gomez-Castro et al., 2021).

#### **4. Spécificité des effets sur les synapses glutamatergiques et conséquences sur les réseaux neuronaux hippocampiques**

##### **Pourquoi les synapses excitatrices sont-elles plus sensibles que les inhibitrices ?**

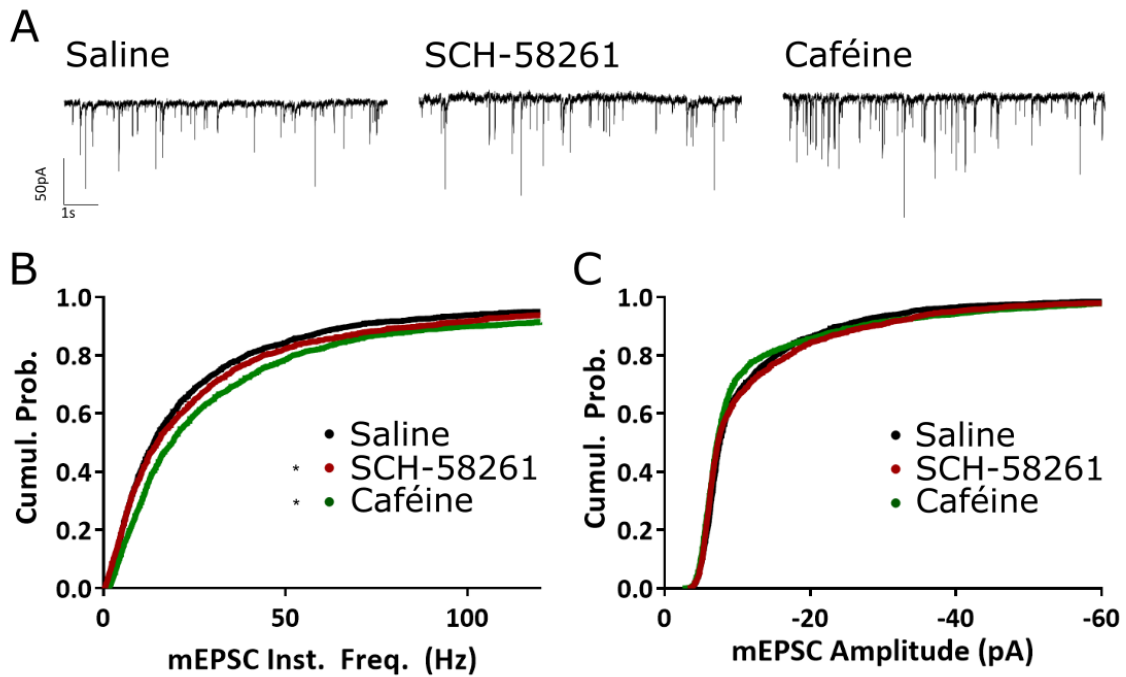
Les **synapses glutamatergiques** sont souvent altérées dans de nombreuses pathologies, comme si elles étaient **plus sensibles dans ces contextes allostatiques**. Cela pourrait être expliqué par cette signalisation neurogliale au sein des synapses excitatrices, qui serait impactée par les contextes inflammatoires qui accompagnent les maladies neurodégénératives (Carvalho et al., 2019).

Une autre explication serait la **présence de sous-types de microglies qui interagiraient spécifiquement avec des synapses glutamatergiques ou GABAergiques** (Favuzzi et al., 2021). Les microglies sont impliquées dans la modulation de la neurotransmission excitatrice et les modèles CX3RC1-KO induisent un excès de synapses glutamatergiques immatures. Les synapses inhibitrices ne sont pas affectées de la même façon (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). Les perturbations de signalisations neurones-microglies ont aussi été reportées pour **affecter différenciellement les types de synapses** inhibitrices dans l'hippocampe. L'activation des microglies réduit la transmission glycinergique et non GABAergique au niveau de la moelle épinière (Cantaut-Belarif et al., 2017)

De plus, dans les cultures hippocampiques, nous avons vu que les  $A_{2A}R$ s n'étaient pas présents à toutes les synapses mais seulement à un sous-groupe de 23,5% des synapses glutamatergiques (**Figure 3**), ce qui suggère que la signalisation observée est seulement opérante au niveau de certaines synapses.

##### **Quels est le rôle de la voie adénosinergique sur la formation des réseaux hippocampiques en développement et matures ?**

Bloquer le  $A_{2A}R$  au cours de la synaptogenèse résulte en un **déséquilibre de la balance excitation/inhibition**, induite respectivement par la diminution de la transmission GABAergique et l'augmentation de la transmission glutamatergique. En effet, des données non publiées du laboratoire montrent une augmentation de la fréquence des courants miniatures postsynaptiques excitateurs (Figure 28B) mais pas de différence dans leur amplitude (Figure 28C) chez des mâles à P21 traités avec du SCH-58261 ou de la caféine entre P3 et P16 (voir figure 23A pour protocole expérimental). Ces données sont cohérentes avec l'augmentation de la densité des synapses glutamatergiques observée dans ces conditions (Figure 23). De plus, les réseaux hippocampiques de ces animaux étaient hyperexcitables. De manière intéressante, les femelles mais pas les mâles montraient une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie.



**Figure 28 : Les traitements au SCH ou à la caféine au cours de la synaptog nese induisent une augmentation de la fréquence mais pas de l'amplitude des mEPSCs chez les mâles.** (A) Traces électrophysiologiques représentatives des courants miniatures postsynaptiques excitateurs (mEPSCs) dans les tranches de cerveaux mâles à P21 après traitement avec une solution saline, le SCH-58261 (0.1mg/kg) ou la caféine (1mg/kg) entre P3 et P16. (B-C) Quantifications de la fréquence (B) et de l'amplitude (C) des mEPSCs après les traitements indiqués. La fréquence des mEPSCs est plus élevée chez les mâles traités avec du SCH ou de la caféine au cours de la synaptog nese.

Le blocage des  $A_{2A}R$ s au cours de la période de synaptog nese induit donc des modifications de l'excitabilité des réseaux hippocampiques *in vivo* qui peuvent être à l'origine de l'émergence de pathologies, et sont différentes chez les mâles et les femelles.

Cependant, l'augmentation des mEPSCs et de la densité des synapses glutamatergiques dans l'hippocampe (Figure 23) observée *in vivo* n'est pas détectée dans le modèle *in vitro* (Figure 8, 9). Ces différences peuvent être expliquées par la variabilité dans les densité et activité des cellules neuronales, astrocytaires et microgliales dans ces deux modèles. Dans le modèle de culture de neurones hippocampiques, le nombre de neurones est élevé et constant, tandis que les astrocytes et microglies prolifèrent à des **densités très différentes**. Les astrocytes forment un « tapis » dans ce modèle *in vitro* en « deux dimensions » et sont présents à une forte densité par rapport aux microglies. Il a en effet été difficile d'estimer la densité moyenne de microglies dans les cultures, qui est très variable dans les conditions d'une même expérience. Ce qui a cependant été observé est que leur nombre est très faible par rapport aux astrocytes ou neurones (Figure 1). Le **ratio neurones/microglies** est un facteur important dans l'étude de la phagocytose des synapses, et obtenir un ratio optimal est

complexe compte tenu des milieux de culture différents adaptés pour la croissance des neurones ou des microglies (Morini et al., 2021). Cela peut expliquer la faible densité des microglies observée dans le modèle *in vitro* présenté, adapté à la croissance et au maintien des neurones, mais aussi la morphologie des microglies et leur état d'activation particulier lorsqu'elles sont en culture. Les résultats obtenus en supprimant ces cellules ou en bloquant C1q, qui est produit par les microglies, restent cependant intéressants pour examiner le rôle de ces cellules dans la régulation des synapses *in vitro*.

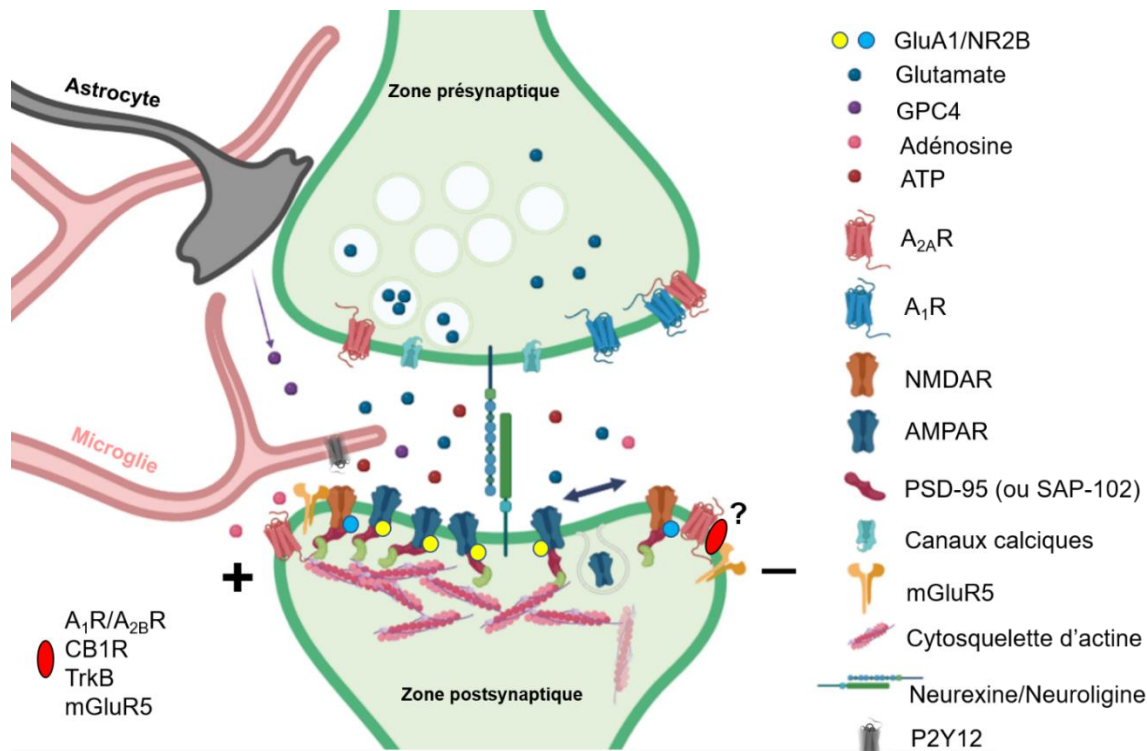
**La densité et la composition des matrices extracellulaires** dans les tissus tridimensionnels sont également nettement différentes de celles des neurones en culture et peuvent impacter le phénotype des cellules (Hu et al., 2021). Les microglies sont très ramifiées dans les modèles *in vivo* et sont plus mobiles. Elles évoluent dans un environnement bien plus compact et dense, et la composition en protéines d'adhésion module leurs interactions avec les astrocytes et les synapses. Les capacités phagocytaires des microglies dépendent aussi de cet environnement et la proximité entre les partenaires de la synapse quadri-partite modifie nettement leurs interactions. Les microglies ont donc une morphologie différente dans un tissu physiologique ou dans un modèle de culture *in vitro*, dans lequel leur forme parfois amiboïde peut d'ailleurs rappeler l'état activé de ces cellules *in vivo*.

Si le blocage pharmacologique du  $A_{2A}R$  *in vivo* au cours de la période de synaptogenèse pourrait affecter le développement des microglies et l'activité des réseaux ainsi que la structure des matrices extracellulaires, le traitement pharmacologique aigu ou sur quelques jours n'aurait pas le même effet dans la culture.

Dans ces travaux, nous n'avons pas exploré **le rôle des astrocytes** ou **des  $A_{2A}Rs$  astrocytaires** dans la régulation des synapses glutamatergiques. Il nous semble pertinent d'étudier cette hypothèse dans la suite de ce projet, au vu de la densité et du rôle de ces cellules dans la physiologie de la synapse. Les astrocytes pourraient permettre de faire le lien entre les processus dépendants des  $A_{2A}Rs$  et de l'adénosine, et ceux impliquant l'activité des réseaux neuronaux hippocampique, via l'ATP et les récepteurs P2X7.

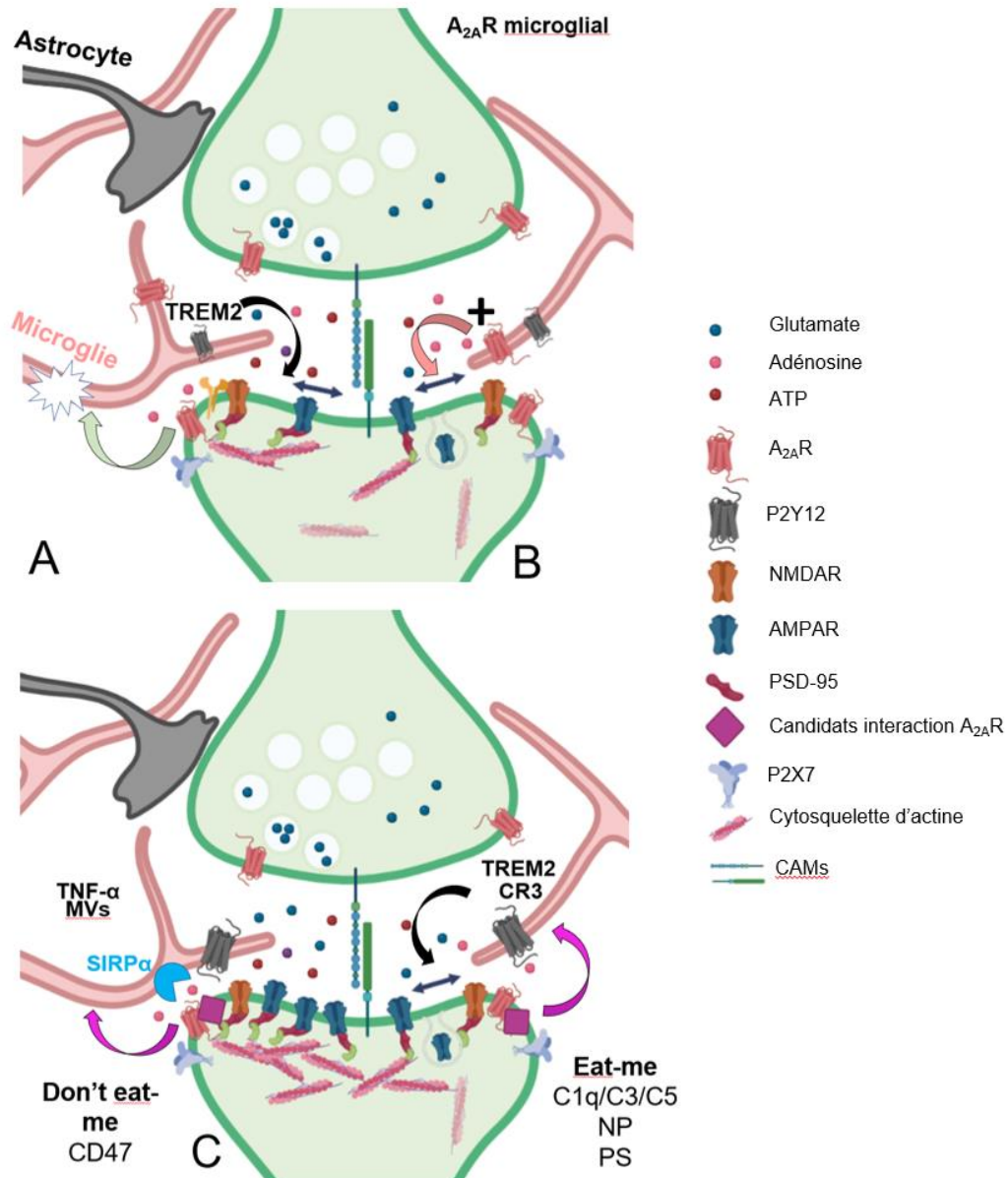
## CONCLUSION GENERALE

Pour conclure, nous avons observé une régulation de la stabilisation des synapses glutamatergiques médiée par le  $A_{2A}R$  neuronal au cours de la synaptogenèse dans l'hippocampe. Les voies canoniques activées par le  $A_{2A}R$  ne seraient pas impliquées dans la régulation. A l'échelle de la synapse, la stabilisation implique le remaniement postsynaptique des récepteurs glutamatergiques et leurs protéines d'échafaudage, du cytosquelette d'actine, des CAMs. Le  $A_{2A}R$  pourrait interagir avec plusieurs protéines qui modulent la plasticité des synapses (Schéma 1). Nous avons vu que la stabilisation des synapses excitatrices par le  $A_{2A}R$  neuronal implique les cellules microgliales, qui médieraient des effets opposés sur les synapses. Si l'hypothèse d'une contribution du  $A_{2A}R$  microglial à cette régulation dans des conditions physiologiques reste à explorer, nous pensons que le  $A_{2A}R$  neuronal initie la communication avec les microglies via la libération d'un facteur soluble ou par des interactions protéiques au niveau de la synapse et/ou avec des protéines présentes sur les microglies. Les protéines candidates pour médier l'interaction  $A_{2A}R$  synaptique-microglies sont les protéines du complément (C1q, C3, C5), les pentraxines neuronales, la phosphatidylsérine ou CD47 (Schéma 2). La modulation des  $A_{2A}R$ s pourrait aussi directement impacter le phénotype microglial, i.e. l'activation des microglies, leurs capacités de phagocytose, et de libération de facteurs synaptotrophiques. Le  $A_{2A}R$  neuronal pourrait agir comme un détecteur d'activité à la synapse et participer à la stabilisation des synapses actives qui ne seront pas éliminées a posteriori. La régulation observée est impliquée dans la mise en place des réseaux neuronaux hippocampiques et pourrait modifier la balance excitation/inhibition en faveur d'une hyperexcitabilité des réseaux, qui serait due à des dynamiques propres à la synapse glutamatergique. En plus de ces spécificités, les effets observés dépendent de la région étudiée dans l'hippocampe mais aussi du sexe des animaux. Les molécules à la synapse interagiraient différemment en fonction des régions et de l'environnement homéostatique ou allostatique du SNC, ce qui pourrait expliquer ces différences.



**Schéma 1** : Protéines impliquées dans la stabilisation des synapses glutamatergiques naissantes par les A<sub>2A</sub>Rs. Au niveau de la synapse glutamatergique active (gauche), du glutamate et de l'ATP sont libérés. L'ATP est hydrolysé en adénosine et le A<sub>2A</sub>R neuronal pérисynaptique détecte l'activité. Les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> régulent la neurotransmission glutamatergique. Les astrocytes libèrent du glypican4 qui favorise l'accumulation des AMPARs contenant des sous-unités GluA1 à la synapse, et leur diffusion latérale à la membrane est réduite. L'activation du A<sub>2A</sub>R peut induire la libération de BDNF qui stabilise PSD-95, une protéine d'échafaudage qui ancre les récepteurs à la membrane et interagit avec le cytosquelette d'actine qui peut consolider la synapse. Les CAMs (ici neurexine et neuroligine) participent aussi à la stabilisation de la synapse. Au niveau de la synapse inactive (droite), la diffusion de GluA1 augmente. Les sous-unités NR2B des NMDARs peuvent participer à l'internalisation des AMPARs, dans la synapse déstabilisée.





**Schéma 2 :** Possibles interactions entre les neurones et les microglies modulant la stabilité de la synapse au cours du développement. L'activation des A<sub>2A</sub>R neuronaux pourrait modifier le phénotype des microglies (activation, expression de TREM2) ce qui impacterait la densité et la plasticité des synapses (A). Le A<sub>2A</sub>R microglial, même si son expression est faible, pourrait directement déstabiliser la synapse, à l'inverse du A<sub>2A</sub>R neuronal (B). Le A<sub>2A</sub>R neuronal pourrait interagir avec des protéines du complément (C1q/C3/C5), des pentraxines neuronales (NP) ou la phosphatidylsérine (PS) pour exposer des signaux « eat-me » et favoriser la déstabilisation puis l'élimination de la synapse (C). La microglie reconnaît ces signaux via des récepteurs spécifiques (TREM2, CR3). Le A<sub>2A</sub>R neuronal pourrait aussi stabiliser la synapse par son interaction avec CD47 qui protège les synapses de l'élimination par sa liaison avec SIRPα sur la microglie. Dans le cas où la synapse est stabilisée, la microglie peut libérer des molécules pour maintenir l'activité synaptique (TNF-α, micro-vésicules).

## Ouverture

L'activité des réseaux est essentielle pour la signalisation neurone-microglie médiée par les A<sub>2A</sub>Rs, permettant de stabiliser ou déstabiliser les synapses excitatrices. Plusieurs études montrent l'importance du sommeil dans les phénomènes de raffinement des circuits neuronaux, au cours du développement mais aussi après des tâches d'apprentissage (Girardeau and Lopes-dos-Santos, 2021).

Au cours du développement, la phase REM (Rapid-eye movement) du sommeil correspond à **50% de la durée du sommeil**, et coïncide avec une **période importante de synaptogénèse et d'élimination des synapses**. Elle serait donc impliquée dans la régulation de la mise en place des réseaux au cours du développement post-natal. Dans le cortex moteur et visuel au cours du développement, pendant cette phase REM, de nouvelles épines formées peuvent être éliminées, et d'autres formées ce qui est caractéristique de la période développementale. Ce contrôle sélectif du nombre de synapses nouvellement formées, l'élimination ou le renforcement de certaines synapses sont importants pour intégrer des informations saillantes dans les réseaux neuronaux. L'élimination ou le renforcement des synapses sont **dépendants de l'activité**, médiés par des courants calciques au sein des dendrites, provoqués par l'activation des NMDARs (Li et al., 2017; Zhou et al., 2020). De plus, l'élimination des synapses par les microglies est affectée en cas de déprivation de sommeil, ce qui montre que l'interaction entre synapses et microglies se maintient toute la journée (Tuan and Lee, 2019).

L'expression de **CX3CR1** par les microglies change au cours des phases jour/nuit et régule les réponses microgliales en fonction du rythme circadien. Par exemple, l'exposition à l'ATP, qui augmente au cours du sommeil, induit une diminution de l'expression de CX3CR1. Les microglies participeraient ainsi à la régulation du sommeil et de l'activité synaptique en fonction des phases jour/nuit (Corsi et al., 2022).

La régulation de l'efficacité des synapses aurait lieu au cours de la journée, en parallèle de l'augmentation des taux d'adénosine (Porkka-Heiskanen et al., 1997), et l'élimination des synapses au cours du sommeil, après l'intégration des activités individuelles des synapses et leurs interactions subséquentes avec les microglies.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32, 19–29. doi: 10.1016/j.tins.2008.10.001.
- Abbrachi, M. P., Cerutil, S., Burnstock, G., Barbieri, D., Biondo, L., Malorni, W., et al. (1995). A novel action for adenosine suggested by apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. 1.
- Agostinho, P., Madeira, D., Dias, L., Simões, A. P., Cunha, R. A., and Canas, P. M. (2020). Purinergic signaling orchestrating neuron-glia communication. *Pharmacol. Res.* 162, 105253. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105253.
- Ahmad, A., Schaack, J. B., White, C. W., and Ahmad, S. (2013). Adenosine A2A receptor-dependent proliferation of pulmonary endothelial cells is mediated through calcium mobilization, PI3-kinase and ERK1/2 pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 566–571. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.115.
- Ahmari, S. E., and Smith, S. J. (2002). Knowing a Nascent Synapse When You See It. *Neuron* 34, 333–336. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00685-2.
- Alçada-Morais, S., Gonçalves, N., Moreno-Juan, V., Andres, B., Ferreira, S., Marques, J. M., et al. (2021). Adenosine A2A Receptors Contribute to the Radial Migration of Cortical Projection Neurons through the Regulation of Neuronal Polarization and Axon Formation. *Cereb. Cortex* 31, 5652–5663. doi: 10.1093/cercor/bhab188.
- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., and Wenthold, R. J. (2007). NMDA Dimeric Receptor Populations and Associated Proteins in Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 8334–8343. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007.
- Allen Brain Atlas: Developing Mouse Brain Available at: [https://developingmouse.brain-map.org/search/show?page\\_num=0&page\\_size=3&no\\_paging=false&exact\\_match=true&search\\_term=Adora2a&search\\_type=gene](https://developingmouse.brain-map.org/search/show?page_num=0&page_size=3&no_paging=false&exact_match=true&search_term=Adora2a&search_type=gene) [Accessed June 7, 2022].
- Allen, N. J., and Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96, 697–708. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056.
- Almeida, T., Rodrigues, R. J., de Mendonça, A., Ribeiro, J. A., and Cunha, R. A. (2003). Purinergic P2 receptors trigger adenosine release leading to adenosine A2A receptor activation and facilitation of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 122, 111–121. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00523-2.
- Alsina, B., Vu, T., and Cohen-Cory, S. (2001). Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat. Neurosci.* 4, 1093–1101. doi: 10.1038/nn735.
- Andersson, M., Blomstrand, F., and Hanse, E. (2007). Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region: Transient heterosynaptic depression. *J. Physiol.* 585, 843–852. doi: 10.1113/jphysiol.2007.142737.

- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., et al. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism: Microglial MVs increase sphingolipid metabolism in neurons. *EMBO J.* 31, 1231–1240. doi: 10.1038/emboj.2011.489.
- Araç, D., Boucard, A. A., Bolliger, M. F., Nguyen, J., Soltis, S. M., Südhof, T. C., et al. (2012). A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis: Cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO J.* 31, 1364–1378. doi: 10.1038/emboj.2012.26.
- Araki, Y., Zeng, M., Zhang, M., and Huganir, R. L. (2015). Rapid Dispersion of SynGAP from Synaptic Spines Triggers AMPA Receptor Insertion and Spine Enlargement during LTP. *Neuron* 85, 173–189. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.023.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H. R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81, 728–739. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.007.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., and Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01349-6.
- Ardais, A. P., Rocha, A. S., Borges, M. F., Fioreze, G. T., Sallaberry, C., Mioranza, S., et al. (2016). Caffeine exposure during rat brain development causes memory impairment in a sex selective manner that is offset by caffeine consumption throughout life. *Behav. Brain Res.* 303, 76–84. doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.026.
- Augusto, E., Gonçalves, F. Q., Real, J. E., Silva, H. B., Pochmann, D., Silva, T. S., et al. (2021). Increased ATP release and CD73-mediated adenosine A2A receptor activation mediate convulsion-associated neuronal damage and hippocampal dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 157, 105441. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105441.
- Augusto, E., Matos, M., Sevigny, J., El-Tayeb, A., Bynoe, M. S., Muller, C. E., et al. (2013). Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)-Mediated Formation of Adenosine Is Critical for the Striatal Adenosine A2A Receptor Functions. *J. Neurosci.* 33, 11390–11399. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5817-12.2013.
- Averaimo, S., Assali, A., Ros, O., Couvet, S., Zagar, Y., Genescu, I., et al. (2016). A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. *Nat. Commun.* 7, 12896. doi: 10.1038/ncomms12896.
- Awasthi, A., Ramachandran, B., Ahmed, S., Benito, E., Shinoda, Y., Nitzan, N., et al. (2019). Synaptotagmin-3 drives AMPA receptor endocytosis, depression of synapse strength, and forgetting. *Science* 363, eaav1483. doi: 10.1126/science.aav1483.
- Badimon, A., Strasburger, H. J., Ayata, P., Chen, X., Nair, A., Ikegami, A., et al. (2020). Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature* 586, 417–423. doi: 10.1038/s41586-020-2777-8.
- Bannai, H., Lévi, S., Schweizer, C., Dahan, M., and Triller, A. (2006). Imaging the lateral diffusion of membrane molecules with quantum dots. *Nat. Protoc.* 1, 2628–2634. doi: 10.1038/nprot.2006.429.

- Barberis, C., Guibert, B., Daudet, F., Charriere, B., and Leviel, V. (1984). In vivo release of adenosine from cat basal ganglia—studies with a push pull cannula. *Neurochem. Int.* 6, 545–551. doi: 10.1016/0197-0186(84)90127-X.
- Bastrikova, N., Gardner, G. A., Reece, J. M., Jeromin, A., and Dudek, S. M. (2008). Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3123–3127. doi: 10.1073/pnas.0800027105.
- Basu, R., Duan, X., Taylor, M. R., Martin, E. A., Muralidhar, S., Wang, Y., et al. (2017). Heterophilic Type II Cadherins Are Required for High-Magnitude Synaptic Potentiation in the Hippocampus. *Neuron* 96, 160-176.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.009.
- Battaglia, S., Renner, M., Russeau, M., Côme, E., Tyagarajan, S. K., and Lévi, S. (2018). Activity-Dependent Inhibitory Synapse Scaling Is Determined by Gephyrin Phosphorylation and Subsequent Regulation of GABA<sub>A</sub> Receptor Diffusion. *eneuro* 5, ENEURO.0203-17.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0203-17.2017.
- Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., et al. (2002). Control of Synaptic Strength by Glial TNF $\alpha$ . *Science* 295, 2282–2285. doi: 10.1126/science.1067859.
- Béchade, C., Cantaut-Belarif, Y., and Bessis, A. (2013). Microglial control of neuronal activity. *Front. Cell. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00032.
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Represa, A., and Gozlan, H. (2004). Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci.* 27, 422–427. doi: 10.1016/j.tins.2004.05.002.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O., and Gaiarsa, J.-L. (1997). GABA<sub>A</sub>, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated ‘ménage à trois.’ 7.
- Bertin, E., Deluc, T., Pilch, K. S., Martinez, A., Pougnet, J.-T., Doudnikoff, E., et al. (2021). Increased surface P2X4 receptor regulates anxiety and memory in P2X4 internalization-defective knock-in mice. *Mol. Psychiatry* 26, 629–644. doi: 10.1038/s41380-019-0641-8.
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., and Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55, 233–238. doi: 10.1002/glia.20459.
- Bhourri, M., Morishita, W., Temkin, P., Goswami, D., Kawabe, H., Brose, N., et al. (2018). Deletion of *LRRTM1* and *LRRTM2* in adult mice impairs basal AMPA receptor transmission and LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115. doi: 10.1073/pnas.1803280115.
- Biederer, T., Kaeser, P. S., and Blanpied, T. A. (2017). Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron* 96, 680–696. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.006.
- Bingol, B., Wang, C.-F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J., and Sheng, M. (2010). Autophosphorylated CaMKII $\alpha$  Acts as a Scaffold to Recruit Proteasomes to Dendritic Spines. *Cell* 140, 567–578. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.024.
- Bjartmar, L., Huberman, A. D., Ullian, E. M., Renteria, R. C., Liu, X., Xu, W., et al. (2006). Neuronal Pentraxins Mediate Synaptic Refinement in the Developing Visual System. *J. Neurosci.* 26, 6269–6281. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4212-05.2006.

- Bliss, T. V. P., and Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.
- Blum, D., Chern, Y., Domenici, M. R., Buée, L., Lin, C.-Y., Rea, W., et al. (2018). The Role of Adenosine Tone and Adenosine Receptors in Huntington's Disease. *J. Caffeine Adenosine Res.* 8, 43–58. doi: 10.1089/caff.2018.0006.
- Bock, A., Annibale, P., Konrad, C., Hannawacker, A., Anton, S. E., Maiellaro, I., et al. (2020). Optical Mapping of cAMP Signaling at the Nanometer Scale. *Cell* 182, 1519-1530.e17. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.035.
- Bohlen, C. J., Friedman, B. A., Dejanovic, B., and Sheng, M. (2019). Microglia in Brain Development, Homeostasis, and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* 53, 263–288. doi: 10.1146/annurev-genet-112618-043515.
- Boison, D., Chen, J.-F., and Fredholm, B. B. (2010). Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ.* 17, 1071–1082. doi: 10.1038/cdd.2009.131.
- Bolliger, M. F., Martinelli, D. C., and Südhof, T. C. (2011). The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2534–2539. doi: 10.1073/pnas.1019577108.
- Bonhoeffer, T., and Yuste, R. (2002). Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 35, 1019–27. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00906-6.
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., and Varani, K. (2016). Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 419–434. doi: 10.1016/j.tips.2016.02.006.
- Borea, P. A., Varani, K., Vincenzi, F., Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A., Merighi, S., et al. (2015). The A<sub>3</sub> Adenosine Receptor: History and Perspectives. *Pharmacol. Rev.* 67, 74–102. doi: 10.1124/pr.113.008540.
- Borroto-Escuela, D. O., Hinz, S., Navarro, G., Franco, R., Müller, C. E., and Fuxe, K. (2018). Understanding the Role of Adenosine A2AR Heteroreceptor Complexes in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *Front. Neurosci.* 12, 43. doi: 10.3389/fnins.2018.00043.
- Boswell-Casteel, R. C., and Hays, F. A. (2017). Equilibrative nucleoside transporters—A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 36, 7–30. doi: 10.1080/15257770.2016.1210805.
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P., and Südhof, T. C. (2005). A Splice Code for trans-Synaptic Cell Adhesion Mediated by Binding of Neuroligin 1 to  $\alpha$ - and  $\beta$ -Neurexins. *Neuron* 48, 229–236. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.026.
- Boué-Grabot, E., and Pankratov, Y. (2017). Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast.* 2017, 1–11. doi: 10.1155/2017/9454275.
- Bourgeois, J., and Rakic, P. (1993). Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *J. Neurosci.* 13, 2801–2820. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-07-02801.1993.

- Brakeman, P. R., Lanahan, A. A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C. A., Huganir, R. L., et al. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284–288. doi: 10.1038/386284a0.
- Bruce-Keller, A. J. (1999). Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J. Neurosci. Res.* 58, 191–201. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19991001)58:1<191::AID-JNR17>3.0.CO;2-E.
- Brüning, F., Noya, S. B., Bange, T., Koutsouli, S., Rudolph, J. D., Tyagarajan, S. K., et al. (2019). Sleep-wake cycles drive daily dynamics of synaptic phosphorylation. *Science* 366, eaav3617. doi: 10.1126/science.aav3617.
- Burgueño, J., Blake, D. J., Benson, M. A., Tinsley, C. L., Esapa, C. T., Canela, E. I., et al. (2003). The Adenosine A2A Receptor Interacts with the Actin-binding Protein  $\alpha$ -Actinin. *J. Biol. Chem.* 278, 37545–37552. doi: 10.1074/jbc.M302809200.
- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1471–1483. doi: 10.1007/s00018-007-6497-0.
- Burry, R. W. (1982). Development of apparent presynaptic elements formed in response to polylysine coated surfaces. *Brain Res.* 247, 1–16. doi: 10.1016/0006-8993(82)91022-8.
- Bynoe, M. S., Viret, C., Yan, A., and Kim, D.-G. (2015). Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood–brain door. *Fluids Barriers CNS* 12, 20. doi: 10.1186/s12987-015-0017-7.
- Cabello, N., Remelli, R., Canela, L., Soriguera, A., Mallol, J., Canela, E. I., et al. (2007). Actin-binding Protein  $\alpha$ -Actinin-1 Interacts with the Metabotropic Glutamate Receptor Type 5b and Modulates the Cell Surface Expression and Function of the Receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 12143–12153. doi: 10.1074/jbc.M608880200.
- Calker, D. van, Müller, M., and Hamprecht, B. (1979). ADENOSINE REGULATES VIA TWO DIFFERENT TYPES OF RECEPTORS, THE ACCUMULATION OF CYCLIC AMP IN CULTURED BRAIN CELLS. *J. Neurochem.* 33, 999–1005. doi: 10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x.
- Calovi, S., Mut-Arbona, P., and Sperlágh, B. (2019). Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience* 405, 137–147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.021.
- Canals, M., Burgueño, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E. I., Mallol, J., et al. (2003a). Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer: Homodimerization of adenosine A2A receptors. *J. Neurochem.* 88, 726–734. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02200.x.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R., et al. (2003b). Adenosine A2A-Dopamine D2 Receptor-Receptor Heteromerization. *J. Biol. Chem.* 278, 46741–46749. doi: 10.1074/jbc.M306451200.
- Canas, P. M., Porciuncula, L. O., Cunha, G. M. A., Silva, C. G., Machado, N. J., Oliveira, J. M. A., et al. (2009). Adenosine A2A Receptor Blockade Prevents Synaptotoxicity and Memory Dysfunction Caused by  $\beta$ -Amyloid Peptides via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J. Neurosci.* 29, 14741–14751. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3728-09.2009.

- Canela, L., Luján, R., Lluís, C., Burgueño, J., Mallol, J., Canela, E. I., et al. (2007). The neuronal Ca<sup>2+</sup>-binding protein 2 (NECAB2) interacts with the adenosine A<sub>2A</sub> receptor and modulates the cell surface expression and function of the receptor. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 1–12. doi: 10.1016/j.mcn.2007.05.007.
- Cantaut-Belarif, Y., Antri, M., Pizzarelli, R., Colasse, S., Vaccari, I., Soares, S., et al. (2017). Microglia control the glycinergic but not the GABAergic synapses via prostaglandin E<sub>2</sub> in the spinal cord. *J. Cell Biol.* 216, 2979–2989. doi: 10.1083/jcb.201607048.
- Carman, A. J., Mills, J. H., Krenz, A., Kim, D.-G., and Bynoe, M. S. (2011). Adenosine Receptor Signaling Modulates Permeability of the Blood-Brain Barrier. *J. Neurosci.* 31, 13272–13280. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3337-11.2011.
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., et al. (2007). Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> and Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 32, 2249–2259. doi: 10.1038/sj.npp.1301375.
- Carta, M., Fièvre, S., Gorlewicz, A., and Mulle, C. (2014). Kainate receptors in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1835–1844. doi: 10.1111/ejn.12590.
- Carvalho, K., Faivre, E., Pietrowski, M. J., Marques, X., Gomez-Murcia, V., Deleau, A., et al. (2019). Exacerbation of C1q dysregulation, synaptic loss and memory deficits in tau pathology linked to neuronal adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Brain* 142, 3636–3654. doi: 10.1093/brain/awz288.
- Carvalho, K., Martin, E., Ces, A., Sarrazin, N., Lagouge-Roussey, P., Nous, C., et al. (2021). P2X<sub>7</sub>-deficiency improves plasticity and cognitive abilities in a mouse model of Tauopathy. *Prog. Neurobiol.* 206, 102139. doi: 10.1016/j.pneurobio.2021.102139.
- Cellai, L., Carvalho, K., Faivre, E., Deleau, A., Vieau, D., Buée, L., et al. (2018). The Adenosinergic Signaling: A Complex but Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 12, 520. doi: 10.3389/fnins.2018.00520.
- Changeux, J.-P., and Danchin, A. (1976). Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* 264, 705–712. doi: 10.1038/264705a0.
- Charalambous, C., Gsandtner, I., Keuerleber, S., Milan-Lobo, L., Kudlacek, O., Freissmuth, M., et al. (2008). Restricted Collision Coupling of the A<sub>2A</sub> Receptor Revisited. *J. Biol. Chem.* 283, 9276–9288. doi: 10.1074/jbc.M706275200.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C. Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., et al. (2007). GAD67-Mediated GABA Synthesis and Signaling Regulate Inhibitory Synaptic Innervation in the Visual Cortex. *Neuron* 54, 889–903. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.015.
- Che, J., Chan, E. S. L., and Cronstein, B. N. (2007). Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Occupancy Stimulates Collagen Expression by Hepatic Stellate Cells via Pathways Involving Protein Kinase A, Src, and Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 Signaling Cascade or p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Mol. Pharmacol.* 72, 1626–1636. doi: 10.1124/mol.107.038760.



- Cheadle, L., Rivera, S. A., Phelps, J. S., Ennis, K. A., Stevens, B., Burkly, L. C., et al. (2020). Sensory Experience Engages Microglia to Shape Neural Connectivity through a Non-Phagocytic Mechanism. *Neuron* 108, 451–468.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.002.
- Chen, J.-F., and Cunha, R. A. (2020). The belated US FDA approval of the adenosine A2A receptor antagonist istradefylline for treatment of Parkinson's disease. *Purinergic Signal*. 16, 167–174. doi: 10.1007/s11302-020-09694-2.
- Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., et al. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408, 936–943. doi: 10.1038/35050030.
- Chen, S. X., Tari, P. K., She, K., and Haas, K. (2010). Neurexin-Neuroigin Cell Adhesion Complexes Contribute to Synaptotropic Dendritogenesis via Growth Stabilization Mechanisms In Vivo. *Neuron* 67, 967–983. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.016.
- Chen, X. (2005). “Kiss-and-Run” Glutamate Secretion in Cultured and Freshly Isolated Rat Hippocampal Astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 9236–9243. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1640-05.2005.
- Chen, Y., Wang, Y., Ertürk, A., Kallop, D., Jiang, Z., Weimer, R. M., et al. (2014). Activity-Induced Nr4a1 Regulates Spine Density and Distribution Pattern of Excitatory Synapses in Pyramidal Neurons. *Neuron* 83, 431–443. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.027.
- Chever, O., Lee, C.-Y., and Rouach, N. (2014). Astroglial Connexin43 Hemichannels Tune Basal Excitatory Synaptic Transmission. *J. Neurosci.* 34, 11228–11232. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0015-14.2014.
- Chien, T., Weng, Y.-T., Chang, S.-Y., Lai, H.-L., Chiu, F.-L., Kuo, H.-C., et al. (2018). GSK3 $\beta$  negatively regulates TRAX, a scaffold protein implicated in mental disorders, for NHEJ-mediated DNA repair in neurons. *Mol. Psychiatry* 23, 2375–2390. doi: 10.1038/s41380-017-0007-z.
- Choi, J., Ko, J., Park, E., Lee, J.-R., Yoon, J., Lim, S., et al. (2002). Phosphorylation of Stargazin by Protein Kinase A Regulates Its Interaction with PSD-95. *J. Biol. Chem.* 277, 12359–12363. doi: 10.1074/jbc.M200528200.
- Choi, J.-H., Sim, S.-E., Kim, J., Choi, D. I., Oh, J., Ye, S., et al. (2018). Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science* 360, 430–435. doi: 10.1126/science.aas9204.
- Choquet, D. (2018). Linking Nanoscale Dynamics of AMPA Receptor Organization to Plasticity of Excitatory Synapses and Learning. *J. Neurosci.* 38, 9318–9329. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2119-18.2018.
- Choquet, D., and Triller, A. (2013). The Dynamic Synapse. *Neuron* 80, 691–703. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.013.
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., et al. (2005). Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020.

- Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., et al. (2010). Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *6*.
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., et al. (2007). Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. *Neuron* 54, 919–931. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.029.
- Chung, W.-S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., et al. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394–400. doi: 10.1038/nature12776.
- Ciruela, F. (2006). Presynaptic Control of Striatal Glutamatergic Neurotransmission by Adenosine A1-A2A Receptor Heteromers. *J. Neurosci.* 26, 2080–2087. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3574-05.2006.
- Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Cunha, R. A., Lluís, C., et al. (2006). Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2427–2431. doi: 10.1007/s00018-006-6216-2.
- Cline, H., and Haas, K. (2008). The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis: The synaptotrophic hypothesis. *J. Physiol.* 586, 1509–1517. doi: 10.1113/jphysiol.2007.150029.
- Cline, H. T. (2001). Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 118–126. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00182-3.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., et al. (2003). Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *J. Biol. Chem.* 278, 1354–1362. doi: 10.1074/jbc.M209454200.
- Cohen-Cory, S. (1999). BDNF Modulates, But Does Not Mediate, Activity-Dependent Branching and Remodeling of Optic Axon Arbors *In Vivo*. *J. Neurosci.* 19, 9996–10003. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-22-09996.1999.
- Cohen-Cory, S. (2002). The Developing Synapse: Construction and Modulation of Synaptic Structures and Circuits. *Science* 298, 770–776. doi: 10.1126/science.1075510.
- Comer, A. L., Jinadasa, T., Sriram, B., Phadke, R. A., Kretsge, L. N., Nguyen, T. P. H., et al. (2020). Increased expression of schizophrenia-associated gene C4 leads to hypoconnectivity of prefrontal cortex and reduced social interaction. *PLOS Biol.* 18, e3000604. doi: 10.1371/journal.pbio.3000604.
- Cong, Q., Soteros, B. M., Wollet, M., Kim, J. H., and Sia, G.-M. (2020). The endogenous neuronal complement inhibitor SRPX2 protects against complement-mediated synapse elimination during development. *Nat. Neurosci.* 23, 1067–1078. doi: 10.1038/s41593-020-0672-0.
- Cooper, D. M. F., Mons, N., and Karpen, J. W. (1995). Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374, 421–424. doi: 10.1038/374421a0.
- Cope, E. C., Briones, B. A., Brockett, A. T., Martinez, S., Vigneron, P.-A., Opendak, M., et al. (2016). Immature Neurons and Radial Glia, But Not Astrocytes or Microglia, Are Altered in

- Adult *Cntnap2* and *Shank3* Mice, Models of Autism. *eneuro* 3, ENEURO.0196-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0196-16.2016.
- Coppi, E., Cellai, L., Maraula, G., Dettori, I., Melani, A., Pugliese, A. M., et al. (2015). Role of adenosine in oligodendrocyte precursor maturation. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi: 10.3389/fncel.2015.00155.
- Coppi, E., Cellai, L., Maraula, G., Pugliese, A. M., and Pedata, F. (2013). Adenosine A2A receptors inhibit delayed rectifier potassium currents and cell differentiation in primary purified oligodendrocyte cultures. *Neuropharmacology* 73, 301–310. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.035.
- Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Forcet, C., Moyses, E., Chédotal, A., and Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 407, 747–750. doi: 10.1038/35037600.
- Corsi, G., Picard, K., Castro, M. A., Garofalo, S., Tucci, F., Chece, G., et al. (2022). Microglia modulate hippocampal synaptic transmission and sleep duration along the light/dark cycle. *Glia* 70, 89–105. doi: 10.1002/glia.24090.
- Craig, A. M., and Boudin, H. (2001). Molecular heterogeneity of central synapses: afferent and target regulation. *Nat. Neurosci.* 4, 569–578. doi: 10.1038/88388.
- Craig, A. M., and Kang, Y. (2007). Neurexin–neuroligin signaling in synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 43–52. doi: 10.1016/j.conb.2007.01.011.
- Cristovão, G., Pinto, M. J., Cunha, R. A., Almeida, R. D., and Gomes, C. A. (2014). Activation of microglia bolsters synapse formation. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi: 10.3389/fncel.2014.00153.
- Cristóvão-Ferreira, S., Navarro, G., Brugarolas, M., Pérez-Capote, K., Vaz, S. H., Fattorini, G., et al. (2013). A1R–A2AR heteromers coupled to Gs and Gi/o proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic Signal.* 9, 433–449. doi: 10.1007/s11302-013-9364-5.
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., et al. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. doi: 10.1038/nature11846.
- Cunha, R. A. (2001a). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.*, 19.
- Cunha, R. A. (2001b). Regulation of the Ecto-Nucleotidase Pathway in Rat Hippocampal Nerve Terminals. *Neurochem. Res.* 26, 979–991. doi: 10.1023/A:1012392719601.
- Cunha, R. A. (2001c). Regulation of the Ecto-Nucleotidase Pathway in Rat Hippocampal Nerve Terminals. *Neurochem. Res.* 26, 979–991. doi: 10.1023/A:1012392719601.
- Cunha, R. A. (2016). How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J. Neurochem.* 139, 1019–1055. doi: 10.1111/jnc.13724.
- Cunha, R. A., Johansson, B., Constantino, M. D., Sebastião, A. M., and Fredholm, B. B. (1996). Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [3H] CGS 21680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal A2A receptors. 11.

- Cunha, R. A., and Ribeiro, J. A. (2000). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neurosci. Lett.* 289, 127–130. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01295-7.
- Cunha, R. A., Sebastião, A. M., and Ribeiro, J. A. (1998). Inhibition by ATP of Hippocampal Synaptic Transmission Requires Localized Extracellular Catabolism by Ecto-Nucleotidases into Adenosine and Channeling to Adenosine A<sub>1</sub> Receptors. *J. Neurosci.* 18, 1987–1995. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-06-01987.1998.
- Cunha, R., Ferre, S., Vaugeois, J.-M., and Chen, J.-F. (2008). Potential Therapeutic Interest of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors in Psychiatric Disorders. *Curr. Pharm. Des.* 14, 1512–1524. doi: 10.2174/138161208784480090.
- Curran, O. E., Qiu, Z., Smith, C., and Grant, S. G. N. (2021). A single-synapse resolution survey of PSD95-positive synapses in twenty human brain regions. *Eur. J. Neurosci.* 54, 6864–6881. doi: 10.1111/ejn.14846.
- Dai, S. S., Zhou, Y. G., Li, W., An, J. H., Li, P., Yang, N., et al. (2010). Local Glutamate Level Dictates Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Regulation of Neuroinflammation and Traumatic Brain Injury. *J. Neurosci.* 30, 5802–5810. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0268-10.2010.
- Daikhin, Y., and Yudkoff, M. (2000). Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia. *J. Nutr.* 130, 1026S–1031S. doi: 10.1093/jn/130.4.1026S.
- Dailey, M. E., and Smith, S. J. (1996). The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *J. Neurosci.* 16, 2983–2994. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-09-02983.1996.
- Dale, N. (2021). Real-time measurement of adenosine and ATP release in the central nervous system. *Purinergic Signal.* 17, 109–115. doi: 10.1007/s11302-020-09733-y.
- Damisah, E. C., Hill, R. A., Rai, A., Chen, F., Rothlin, C. V., Ghosh, S., et al. (2020). Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo. *Sci. Adv.* 6, eaba3239. doi: 10.1126/sciadv.aba3239.
- Daré, E., Schulte, G., Karovic, O., Hammarberg, C., and Fredholm, B. B. (2007). Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol. Behav.* 92, 15–20. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.05.031.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., et al. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758. doi: 10.1038/nn1472.
- De Paola, V., Arber, S., and Caroni, P. (2003). AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat. Neurosci.* 6, 491–500. doi: 10.1038/nn1046.
- Dejanovic, B., Huntley, M. A., De Mazière, A., Meilandt, W. J., Wu, T., Srinivasan, K., et al. (2018). Changes in the Synaptic Proteome in Tauopathy and Rescue of Tau-Induced Synapse Loss by C1q Antibodies. *Neuron* 100, 1322–1336.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.014.
- Di Angelantonio, S., Bertollini, C., Piccinin, S., Rosito, M., Trettel, F., Pagani, F., et al. (2015). Basal adenosine modulates the functional properties of AMPA receptors in mouse

hippocampal neurons through the activation of A1R A2AR and A3R. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi: 10.3389/fncel.2015.00409.

Di Palma, M., Sartini, S., Lattanzi, D., Cuppini, R., Pita-Rodriguez, M., Diaz-Carmenate, Y., et al. (2020). Evidence for the existence of A2AR-TrkB heteroreceptor complexes in the dorsal hippocampus of the rat brain: Potential implications of A2AR and TrkB interplay upon ageing. *Mech. Ageing Dev.* 190, 111289. doi: 10.1016/j.mad.2020.111289.

Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., and Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15–31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020.

Dias, L., Lopes, C. R., Gonçalves, F. Q., Nunes, A., Pochmann, D., Machado, N. J., et al. (2021). Crosstalk Between ATP-P2X7 and Adenosine A2A Receptors Controlling Neuroinflammation in Rats Subject to Repeated Restraint Stress. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 639322. doi: 10.3389/fncel.2021.639322.

Dias, R. B., Ribeiro, J. A., and Sebastião, A. M. (2012). Enhancement of AMPA currents and GluR1 membrane expression through PKA-coupled adenosine A2A receptors. *Hippocampus* 22, 276–291. doi: 10.1002/hipo.20894.

Dias, R. B., Rombo, D. M., Ribeiro, J. A., Henley, J. M., and Sebastião, A. M. (2013). Adenosine: setting the stage for plasticity. *Trends Neurosci.* 36, 248–257. doi: 10.1016/j.tins.2012.12.003.

Diogenes, M. J. (2004). Activation of Adenosine A2A Receptor Facilitates Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulation of Synaptic Transmission in Hippocampal Slices. *J. Neurosci.* 24, 2905–2913. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4454-03.2004.

Diogenes, M. J., Neves-Tome, R., Fucile, S., Martinello, K., Scianni, M., Theofilas, P., et al. (2014). Homeostatic Control of Synaptic Activity by Endogenous Adenosine is Mediated by Adenosine Kinase. *Cereb. Cortex* 24, 67–80. doi: 10.1093/cercor/bhs284.

Dissing-Olesen, L., LeDue, J. M., Rungta, R. L., Hefendehl, J. K., Choi, H. B., and MacVicar, B. A. (2014). Activation of Neuronal NMDA Receptors Triggers Transient ATP-Mediated Microglial Process Outgrowth. *J. Neurosci.* 34, 10511–10527. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0405-14.2014.

Dobie, F. A., and Craig, A. M. (2011). Inhibitory Synapse Dynamics: Coordinated Presynaptic and Postsynaptic Mobility and the Major Contribution of Recycled Vesicles to New Synapse Formation. *J. Neurosci.* 31, 10481–10493. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6023-10.2011.

Doré, A. S., Robertson, N., Errey, J. C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., et al. (2011). Structure of the Adenosine A2A Receptor in Complex with ZM241385 and the Xanthines XAC and Caffeine. *Structure* 19, 1283–1293. doi: 10.1016/j.str.2011.06.014.

Dou, Y., Wu, H., Li, H., Qin, S., Wang, Y., Li, J., et al. (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res.* 22, 1022–1033. doi: 10.1038/cr.2012.10.

Druart, M., and Le Magueresse, C. (2019). Emerging Roles of Complement in Psychiatric Disorders. *Front. Psychiatry* 10, 573. doi: 10.3389/fpsy.2019.00573.

- Du, H., Tan, Y., Li, C.-H., Zhao, Y., Li, P., Ning, Y.-L., et al. (2022). High glutamate concentration reverses the inhibitory effect of microglial adenosine 2A receptor on NLRP3 inflammasome assembly and activation. *Neurosci. Lett.* 769, 136431. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136431.
- Dunwiddie, T. V., and Masino, S. A. (2001). The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 31–55. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.31.
- Durand, G. M., Kovalchuk, Y., and Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381, 71–75. doi: 10.1038/381071a0.
- Dzhandzhugazyan, K., and Bock, E. (1993). Demonstration of (Ca<sup>2+</sup> -Mg<sup>2+</sup> -ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett.* 336, 279–283. doi: 10.1016/0014-5793(93)80820-K.
- Ehlers, M. D. (2000). Reinsertion or Degradation of AMPA Receptors Determined by Activity-Dependent Endocytic Sorting. *Neuron* 28, 511–525. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00129-X.
- Ehlers, M. D., Heine, M., Groc, L., Lee, M.-C., and Choquet, D. (2007). Diffusional Trapping of GluR1 AMPA Receptors by Input-Specific Synaptic Activity. *Neuron* 54, 447–460. doi: 10.1016/j.neuron.2007.04.010.
- Elmore, M. R. P., Najafi, A. R., Koike, M. A., Dagher, N. N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., et al. (2014). Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. *Neuron* 82, 380–397. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.040.
- Elward, K. (2003). “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol. Immunol.* 40, 85–94. doi: 10.1016/S0161-5890(03)00109-3.
- Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A. M., Dobrenis, K., and Pollard, J. W. (2011). Absence of Colony Stimulation Factor-1 Receptor Results in Loss of Microglia, Disrupted Brain Development and Olfactory Deficits. *PLoS ONE* 6, e26317. doi: 10.1371/journal.pone.0026317.
- Esteban, J. A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Haganir, R. L., and Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* 6, 136–143. doi: 10.1038/nn997.
- Eyo, U. B., Gu, N., De, S., Dong, H., Richardson, J. R., and Wu, L.-J. (2015). Modulation of Microglial Process Convergence Toward Neuronal Dendrites by Extracellular Calcium. *J. Neurosci.* 35, 2417–2422. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3279-14.2015.
- Fastbom, J., Pazos, A., Proet, A., and Palacios, J. M. (1987). ADENOSINE A<sub>1</sub> RECEPTORS IN THE HUMAN BRAIN: A QUANTITATIVE AUTORADIOGRAPHIC STUDY. 13.
- Faust, T. E., Gunner, G., and Schafer, D. P. (2021). Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 22, 657–673. doi: 10.1038/s41583-021-00507-y.

- Favuzzi, E., Huang, S., Saldi, G. A., Binan, L., Ibrahim, L. A., Fernández-Otero, M., et al. (2021). GABA-receptive microglia selectively sculpt developing inhibitory circuits. *Cell* 184, 4048–4063.e32. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.018.
- Fazeli, W. (2017). Early-life exposure to caffeine affects the construction and activity of cortical networks in mice. *Exp. Neurol.*, 16.
- Ferré, S., and Ciruela, F. (2019). Functional and Neuroprotective Role of Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Heterotetramers. *J. Caffeine Adenosine Res.* 9, 89–97. doi: 10.1089/caff.2019.0008.
- Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A. S., Lluís, C., and Franco, R. (2007). Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 30, 440–446. doi: 10.1016/j.tins.2007.07.001.
- Ferré, S., Quiroz, C., Woods, A., Cunha, R., Popoli, P., Ciruela, F., et al. (2008). An Update on Adenosine A<sub>2A</sub>-Dopamine D<sub>2</sub> Receptor Interactions: Implications for the Function of G Protein-Coupled Receptors. *Curr. Pharm. Des.* 14, 1468–1474. doi: 10.2174/138161208784480108.
- Ferré, S., Woods, A. S., Navarro, G., Aymerich, M., Lluís, C., and Franco, R. (2010). Calcium-mediated modulation of the quaternary structure and function of adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor heteromers. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 67–72. doi: 10.1016/j.coph.2009.10.002.
- Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V., and Harris, K. M. (1998). Synaptogenesis Via Dendritic Filopodia in Developing Hippocampal Area CA1. *J. Neurosci.* 18, 8900–8911. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-21-08900.1998.
- Fiebich, B. L., Biber, K., Lieb, K., Van Calker, D., Berger, M., Bauer, J., et al. (1996). Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A<sub>2A</sub>-receptors. *Glia* 18, 152–180. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199610)18:2<152::AID-GLIA7>3.0.CO;2-2.
- Filipello, F., Morini, R., Corradini, I., Zerbi, V., Canzi, A., Michalski, B., et al. (2018). The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity* 48, 979–991.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.016.
- Fischer, E. (1902). Syntheses in the purine and sugar group. *Nobel Lect.*, 15.
- Flajolet, M., Wang, Z., Futter, M., Shen, W., Nuangchamng, N., Bendor, J., et al. (2008). FGF acts as a co-transmitter through adenosine A<sub>2A</sub> receptor to regulate synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 11, 1402–1409. doi: 10.1038/nn.2216.
- Fossati, M., and Charrier, C. (2021). Trans-synaptic interactions of ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 66, 85–92. doi: 10.1016/j.conb.2020.09.001.
- Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., and Martínez-Pinilla, E. (2013). Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Nutrients* 5, 4159–4173. doi: 10.3390/nu5104159.
- Frank, R. A., and Grant, S. G. (2017). Supramolecular organization of NMDA receptors and the postsynaptic density. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45, 139–147. doi: 10.1016/j.conb.2017.05.019.

- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, K. T., Jacobson, K. A., et al. (1994). VI. Nomenclature and Classification of Purinoceptors. 31.
- Fredholm, B. B., Chen, J.-F., Cunha, R. A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J.-M. (2005). "Adenosine and Brain Function," in *International Review of Neurobiology* (Elsevier), 191–270. doi: 10.1016/S0074-7742(05)63007-3.
- Friedman, H. V., Bresler, T., Garner, C. C., and Ziv, N. E. (2000). Assembly of New Individual Excitatory Synapses: Time Course and Temporal Order of Synaptic Molecule Recruitment. *Neuron* 27, 13.
- Fukata, Y., Hirano, Y., Miyazaki, Y., Yokoi, N., and Fukata, M. (2021). Trans-synaptic LGI1–ADAM22–MAGUK in AMPA and NMDA receptor regulation. *Neuropharmacology* 194, 108628. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108628.
- Gambrill, A. C., and Barria, A. (2011). NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5855–5860. doi: 10.1073/pnas.1012676108.
- Garcia-Agudo, L. F., Janova, H., Sendler, L. E., Arinrad, S., Steixner, A. A., Hassouna, I., et al. (2019). Genetically induced brain inflammation by *Cnp* deletion transiently benefits from microglia depletion. *FASEB J.* 33, 8634–8647. doi: 10.1096/fj.201900337R.
- Garrett, A. M., and Weiner, J. A. (2009). Control of CNS Synapse Development by -Protocadherin-Mediated Astrocyte-Neuron Contact. *J. Neurosci.* 29, 11723–11731. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2818-09.2009.
- Gavrilov, N., Golyagina, I., Brazhe, A., Scimemi, A., Turlapov, V., and Semyanov, A. (2018). Astrocytic Coverage of Dendritic Spines, Dendritic Shafts, and Axonal Boutons in Hippocampal Neuropil. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 248. doi: 10.3389/fncel.2018.00248.
- Gebicke-Haerter, P. J., Northoff, H., Berger, M., and Calker', D. V. (1996). Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. 6.
- Genovese, T., Melani, A., Esposito, E., Mazzon, E., Di Paola, R., Bramanti, P., et al. (2009). THE SELECTIVE ADENOSINE A2A RECEPTOR AGONIST CGS 21680 REDUCES JNK MAPK ACTIVATION IN OLIGODENDROCYTES IN INJURED SPINAL CORD. *Shock* 32, 578–585. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181a20792.
- George, J., Cunha, R. A., Mulle, C., and Amédée, T. (2016). Microglia-derived purines modulate mossy fibre synaptic transmission and plasticity through P2X<sub>4</sub> and A<sub>1</sub> receptors. *Eur. J. Neurosci.* 43, 1366–1378. doi: 10.1111/ejn.13191.
- George, J., Gonçalves, F. Q., Cristóvão, G., Rodrigues, L., Meyer Fernandes, J. R., Gonçalves, T., et al. (2015). Different danger signals differently impact on microglial proliferation through alterations of ATP release and extracellular metabolism: ATP Metabolism Tunes Microglia Proliferation. *Glia* 63, 1636–1645. doi: 10.1002/glia.22833.
- Ghosh, A., and Greenberg, M. E. (1995). Calcium Signaling in Neurons: Molecular Mechanisms and Cellular Consequences. *Science* 268, 239–247. doi: 10.1126/science.7716515.



- Gill, I., Droubi, S., Giovedi, S., Fedder, K., Bury, L. A. D., Bosco, F., et al. (2014). Presynaptic NMDA receptors: dynamics and distribution in developing axons *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.*, jcs.162362. doi: 10.1242/jcs.162362.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845. doi: 10.1126/science.1194637.
- Girardeau, G., and Lopes-dos-Santos, V. (2021). Brain neural patterns and the memory function of sleep. *Science* 374, 560–564. doi: 10.1126/science.abi8370.
- Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D. I., Gonçalves, N., et al. (2013). Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *J. Neuroinflammation* 10, 780. doi: 10.1186/1742-2094-10-16.
- Gomez-Castro, F., Zappettini, S., Pressey, J. C., Silva, C. G., Rousseau, M., Gervasi, N., et al. (2021). Convergence of adenosine and GABA signaling for synapse stabilization during development. *Science* 374, eabk2055. doi: 10.1126/science.abk2055.
- Gracia, E., Pérez-Capote, K., Moreno, E., Barkešová, J., Mallol, J., Lluís, C., et al. (2011). A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem. J.* 435, 701–709. doi: 10.1042/BJ20101749.
- Gross, G. G., Junge, J. A., Mora, R. J., Kwon, H.-B., Olson, C. A., Takahashi, T. T., et al. (2013). Recombinant Probes for Visualizing Endogenous Synaptic Proteins in Living Neurons. *Neuron* 78, 971–985. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.017.
- Gsandtner, I., Charalambous, C., Stefan, E., Ogris, E., Freissmuth, M., and Zezula, J. (2005). Heterotrimeric G Protein-independent Signaling of a G Protein-coupled Receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 31898–31905. doi: 10.1074/jbc.M506515200.
- Gubitz, A. K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K. A., and Richardson, P. J. (2002). Dual Signalling by the Adenosine A2a Receptor Involves Activation of Both N- and P-Type Calcium Channels by Different G Proteins and Protein Kinases in the Same Striatal Nerve Terminals. *J. Neurochem.* 67, 374–381. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67010374.x.
- Gutlerner, J. L., Penick, E. C., Snyder, E. M., and Kauer, J. A. (2002). Novel Protein Kinase A-Dependent Long-Term Depression of Excitatory Synapses. *Neuron* 36, 921–931. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01051-6.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 279, 509–514. doi: 10.1126/science.279.5350.509.
- Halldner, L., Lopes, L. V., Darvas, E., Lindström, K., Johansson, B., Ledent, C., et al. (2004). Binding of adenosine receptor ligands to brain of adenosine receptor knock-out mice: evidence that CGS 21680 binds to A1 receptors in hippocampus. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370, 270–278. doi: 10.1007/s00210-004-0970-1.

- Hamby, M. E., Uliasz, T. F., Hewett, S. J., and Hewett, J. A. (2006). Characterization of an improved procedure for the removal of microglia from confluent monolayers of primary astrocytes. *J. Neurosci. Methods* 150, 128–137. doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.06.016.
- Han, S., Nam, J., Li, Y., Kim, S., Cho, S.-H., Cho, Y. S., et al. (2010). Regulation of Dendritic Spines, Spatial Memory, and Embryonic Development by the TANC Family of PSD-95-Interacting Proteins. *J. Neurosci.* 30, 15102–15112. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3128-10.2010.
- Harada, K., Kamiya, T., and Tsuboi, T. (2016). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front. Neurosci.* 9. doi: 10.3389/fnins.2015.00499.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W.-B., et al. (2006). The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512–1519. doi: 10.1038/nn1805.
- Heese, K., Fiebich, B. L., Bauer, J., and Otten, U. (1997). Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A<sub>2a</sub>-receptors. *Neurosci. Lett.* 231, 83–86. doi: 10.1016/S0304-3940(97)00545-4.
- Heine, M., and Holcman, D. (2020). Asymmetry Between Pre- and Postsynaptic Transient Nanodomains Shapes Neuronal Communication. *Trends Neurosci.* 43, 182–196. doi: 10.1016/j.tins.2020.01.005.
- Herzog, E., Takamori, S., Jahn, R., Brose, N., and Wojcik, S. M. (2006). Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J. Neurochem.* 99, 1011–1018. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04144.x.
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L., Means, T. K., et al. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* 16, 1896–1905. doi: 10.1038/nn.3554.
- Hines, D. J., and Haydon, P. G. (2014). Astrocytic adenosine: from synapses to psychiatric disorders. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130594. doi: 10.1098/rstb.2013.0594.
- Hinz, S., Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Seibt, B. F., Ammon, Y.-C., de Filippo, E., et al. (2018). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor ligand recognition and signaling is blocked by A<sub>2B</sub> receptors. *Oncotarget* 9, 13593–13611. doi: 10.18632/oncotarget.24423.
- Honig, B., and Shapiro, L. (2020). Adhesion Protein Structure, Molecular Affinities, and Principles of Cell-Cell Recognition. *Cell* 181, 520–535. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.010.
- Hopf, F. W., Waters, J., Mehta, S., and Smith, S. J. (2002). Stability and Plasticity of Developing Synapses in Hippocampal Neuronal Cultures. *J. Neurosci.* 22, 775–781. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00775.2002.
- Hoze, N., Nair, D., Hosy, E., Sieben, C., Manley, S., Herrmann, A., et al. (2012). Heterogeneity of AMPA receptor trafficking and molecular interactions revealed by superresolution analysis of live cell imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17052–17057. doi: 10.1073/pnas.1204589109.
- Hruska, M., Henderson, N. T., Xia, N. L., Le Marchand, S. J., and Dalva, M. B. (2015). Anchoring and synaptic stability of PSD-95 is driven by ephrin-B3. *Nat. Neurosci.* 18, 1594–1605. doi: 10.1038/nn.4140.

- Hu, X., Ballo, L., Pietila, L., Viesselmann, C., Ballweg, J., Lombard, D., et al. (2011). BDNF-Induced Increase of PSD-95 in Dendritic Spines Requires Dynamic Microtubule Invasions. *J. Neurosci.* 31, 15597–15603. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2445-11.2011.
- Hu, Y., Huang, G., Tian, J., Qiu, J., Jia, Y., Feng, D., et al. (2021). Matrix stiffness changes affect astrocyte phenotype in an in vitro injury model. *NPG Asia Mater.* 13, 35. doi: 10.1038/s41427-021-00304-0.
- Hua, J. Y., and Smith, S. J. (2004). Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat. Neurosci.* 7, 327–332. doi: 10.1038/nn1218.
- Huang, Z. J., and Scheiffele, P. (2008). GABA and neuroligin signaling: linking synaptic activity and adhesion in inhibitory synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 77–83. doi: 10.1016/j.conb.2008.05.008.
- Huang, Z.-L., Qu, W.-M., Eguchi, N., Chen, J.-F., Schwarzschild, M. A., Fredholm, B. B., et al. (2005). Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat. Neurosci.* 8, 858–859. doi: 10.1038/nn1491.
- Hubel, D. H., Wiesel, T. N., and LeVay, S. (1977). Plasticity of Ocular Dominance Columns in Monkey Striate Cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 278, 377–409.
- Huh, G. S., Boulanger, L. M., Du, H., Riquelme, P. A., Brotz, T. M., and Shatz, C. J. (2000). Functional Requirement for Class I MHC in CNS Development and Plasticity. *Science* 290, 2155–2159. doi: 10.1126/science.290.5499.2155.
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., et al. (2013). Microglia release ATP by exocytosis: Microglia Exocytose ATP. *Glia* 61, 1320–1330. doi: 10.1002/glia.22517.
- Inoue, A., and Okabe, S. (2003). The dynamic organization of postsynaptic proteins: translocating molecules regulate synaptic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 332–340. doi: 10.1016/S0959-4388(03)00077-1.
- Inoue, K. (2002). Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40, 156–163. doi: 10.1002/glia.10150.
- Itami, C., Kimura, F., Kohno, T., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Tsumoto, T., et al. (2003). Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of “silent” synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13069–13074. doi: 10.1073/pnas.2131948100.
- Jacobson, K. A., and Gao, Z.-G. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 247–264. doi: 10.1038/nrd1983.
- Jacobson, K. A., Tosh, D. K., Jain, S., and Gao, Z.-G. (2019). Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 124. doi: 10.3389/fncel.2019.00124.
- Jebelli, J., Piers, T., and Pocock, J. (2015). Selective Depletion of Microglia from Cerebellar Granule Cell Cultures Using L-leucine Methyl Ester. *J. Vis. Exp.*, 52983. doi: 10.3791/52983.

- Jeon, S. J., Rhee, S. Y., Ryu, J. H., Cheong, J. H., Kwon, K., Yang, S.-I., et al. (2011). Activation of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Up-Regulates BDNF Expression in Rat Primary Cortical Neurons. *Neurochem. Res.* 36, 2259–2269. doi: 10.1007/s11064-011-0550-y.
- Jiang, M., Polepalli, J., Chen, L. Y., Zhang, B., Südhof, T. C., and Malenka, R. C. (2017). Conditional ablation of neuroligin-1 in CA1 pyramidal neurons blocks LTP by a cell-autonomous NMDA receptor-independent mechanism. *Mol. Psychiatry* 22, 375–383. doi: 10.1038/mp.2016.80.
- Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V., and Kosaka, T. (2007). Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: A stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55, 1334–1347. doi: 10.1002/glia.20552.
- Joly, E., and Hudrisier, D. (2003). What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat. Immunol.* 4, 815–815. doi: 10.1038/ni0903-815.
- Jontes, J. D., Buchanan, J., and Smith, S. J. (2000). Growth cone and dendrite dynamics in zebrafish embryos: early events in synaptogenesis imaged in vivo. *Nat. Neurosci.* 3, 231–237. doi: 10.1038/72936.
- Jung, J., Shin, Y. H., Konishi, H., Lee, S. J., and Kiyama, H. (2013). Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 488–493. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.009.
- Kamimura, K., and Maeda, N. (2021). Glypicans and Heparan Sulfate in Synaptic Development, Neural Plasticity, and Neurological Disorders. *Front. Neural Circuits* 15, 595596. doi: 10.3389/fncir.2021.595596.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380. doi: 10.1152/physrev.00019.2008.
- Kaster, M. P., Machado, N. J., Silva, H. B., Nunes, A., Ardais, A. P., Santana, M., et al. (2015). Caffeine acts through neuronal adenosine A<sub>2A</sub> receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 7833–7838. doi: 10.1073/pnas.1423088112.
- Katz, L. C., and Shatz, C. J. (1996). Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits. *Sci. New Ser.* 274, 1133–1138.
- Kayser, M. S., Nolt, M. J., and Dalva, M. B. (2008). EphB Receptors Couple Dendritic Filopodia Motility to Synapse Formation. *Neuron* 59, 56–69. doi: 10.1016/j.neuron.2008.05.007.
- Kedia, S., Ramanan, N., and Nair, D. (2021). Quantifying molecular aggregation by super resolution microscopy within an excitatory synapse from mouse hippocampal neurons. *STAR Protoc.* 2, 100470. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100470.
- Kerchner, G. A., and Nicoll, R. A. (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 813–825. doi: 10.1038/nrn2501.
- Kesner, P., Schohl, A., Warren, E. C., Ma, F., and Ruthazer, E. S. (2020). Postsynaptic and Presynaptic NMDARs Have Distinct Roles in Visual Circuit Development. *Cell Rep.* 32, 107955. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107955.

- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* 77, 10–18. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.023.
- Keuerleber, S., Gsandtner, I., and Freissmuth, M. (2011). From cradle to twilight: The carboxyl terminus directs the fate of the A<sub>2A</sub>-adenosine receptor. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1350–1357. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.05.009.
- Khayat, M. T., and Nayeem, M. A. (2017). The Role of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor, CYP450s, and PPARs in the Regulation of Vascular Tone. *BioMed Res. Int.* 2017, 1–13. doi: 10.1155/2017/1720920.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 771–781. doi: 10.1038/nrn1517.
- Kim, J. H., Liao, D., Lau, L.-F., and Huganir, R. L. (1998). SynGAP: a Synaptic RasGAP that Associates with the PSD-95/SAP90 Protein Family. *Neuron* 20, 683–691. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81008-9.
- Kim, J., Zhao, T., Petralia, R. S., Yu, Y., Peng, H., Myers, E., et al. (2012). mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat. Methods* 9, 96–102. doi: 10.1038/nmeth.1784.
- Klyuch, B. P., Dale, N., and Wall, M. J. (2012). Deletion of Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Reveals Direct Action Potential-Dependent Adenosine Release. *J. Neurosci.* 32, 3842–3847. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6052-11.2012.
- Kouvaros, S., and Papatheodoropoulos, C. (2016). Major dorsoventral differences in the modulation of the local CA1 hippocampal network by NMDA, mGlu5, adenosine A<sub>2A</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors. *Neuroscience* 317, 47–64. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.059.
- Kovács, R. Á., Vadász, H., Bulyáki, É., Török, G., Tóth, V., Mátyás, D., et al. (2021). Identification of Neuronal Pentraxins as Synaptic Binding Partners of C1q and the Involvement of NP1 in Synaptic Pruning in Adult Mice. *Front. Immunol.* 11, 599771. doi: 10.3389/fimmu.2020.599771.
- Krania, P., Dimou, E., Bantouna, M., Kouvaros, S., Tsiamak, E., Papatheodoropoulos, C., et al. (2018). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are required for glutamate mGluR5- and dopamine D1 receptor-evoked ERK1/2 phosphorylation in rat hippocampus: involvement of NMDA receptor. *J. Neurochem.* 145, 217–231. doi: 10.1111/jnc.14268.
- Kucukdereli, H., Allen, N. J., Lee, A. T., Feng, A., Ozlu, M. I., Conatser, L. M., et al. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108. doi: 10.1073/pnas.1104977108.
- Kust, B. M., Biber, K., Van Calker, D., and Gebicke-Haerter, P. J. (1999). Regulation of K<sup>+</sup> channel mRNA expression by stimulation of adenosine A<sub>2A</sub>-receptors in cultured rat microglia. *Glia* 25, 120–130. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(19990115)25:2<120::AID-GLIA3>3.0.CO;2-D.

- Kwon, H.-B., and Sabatini, B. L. (2011). Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* 474, 100–104. doi: 10.1038/nature09986.
- Lalo, U., Palygin, O., Verkhatsky, A., Grant, S. G. N., and Pankratov, Y. (2016). ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Sci. Rep.* 6, 33609. doi: 10.1038/srep33609.
- Landolt, H.-P. (2012). “No Thanks, Coffee Keeps Me Awake”: Individual Caffeine Sensitivity Depends on ADORA2A Genotype. *Sleep* 35, 899–900. doi: 10.5665/sleep.1942.
- Latini, S., and Pedata, F. (2008). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations: Adenosine release in the brain. *J. Neurochem.* 79, 463–484. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00607.x.
- Laurent, C., Burnouf, S., Ferry, B., Batalha, V. L., Coelho, J. E., Baqi, Y., et al. (2016). A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Mol. Psychiatry* 21, 97–107. doi: 10.1038/mp.2014.151.
- Laursen, N. S., Pedersen, D. V., Gytz, H., Zarantonello, A., Bernth Jensen, J. M., Hansen, A. G., et al. (2020). Functional and Structural Characterization of a Potent C1q Inhibitor Targeting the Classical Pathway of the Complement System. *Front. Immunol.* 11, 1504. doi: 10.3389/fimmu.2020.01504.
- Lavoie-Cardinal, F., Bilodeau, A., Lemieux, M., Gardner, M.-A., Wiesner, T., Laramée, G., et al. (2020). Neuronal activity remodels the F-actin based submembrane lattice in dendrites but not axons of hippocampal neurons. *Sci. Rep.* 10, 11960. doi: 10.1038/s41598-020-68180-2.
- Lazarus, M., Chen, J.-F., Huang, Z.-L., Urade, Y., and Fredholm, B. B. (2017). “Adenosine and Sleep,” in *Sleep-Wake Neurobiology and Pharmacology Handbook of Experimental Pharmacology.*, eds. H.-P. Landolt and D.-J. Dijk (Cham: Springer International Publishing), 359–381. doi: 10.1007/164\_2017\_36.
- Lazarus, M., Oishi, Y., Bjorness, T. E., and Greene, R. W. (2019). Gating and the Need for Sleep: Dissociable Effects of Adenosine A1 and A2A Receptors. *Front. Neurosci.* 13, 740. doi: 10.3389/fnins.2019.00740.
- Lee, C.-C., Chang, C.-P., Lin, C.-J., Lai, H.-L., Kao, Y.-H., Cheng, S.-J., et al. (2018). Adenosine Augmentation Evoked by an ENT1 Inhibitor Improves Memory Impairment and Neuronal Plasticity in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 8936–8952. doi: 10.1007/s12035-018-1030-z.
- Lee, F. S., and Chao, M. V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3555–3560. doi: 10.1073/pnas.061020198.
- Lee, H. U., Yamazaki, Y., Tanaka, K. F., Furuya, K., Sokabe, M., Hida, H., et al. (2013). Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 61, 210–224. doi: 10.1002/glia.22427.
- Lee, J. Y., Jhun, B. S., Oh, Y. T., Lee, J. H., Choe, W., Baik, H. H., et al. (2006). Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF- $\kappa$ B activation in murine BV2 microglial cells. *Neurosci. Lett.* 396, 1–6. doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.004.

- Lee, S. J., Lodder, B., Chen, Y., Patriarchi, T., Tian, L., and Sabatini, B. L. (2021). Cell-type-specific asynchronous modulation of PKA by dopamine in learning. *Nature* 590, 451–456. doi: 10.1038/s41586-020-03050-5.
- Lee, S.-J., Wei, M., Zhang, C., Maxeiner, S., Pak, C., Calado Botelho, S., et al. (2017). Presynaptic Neuronal Pentraxin Receptor Organizes Excitatory and Inhibitory Synapses. *J. Neurosci.* 37, 1062–1080. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2768-16.2016.
- Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Litvina, E. Y., Welsh, C. A., Chang, S. T., Frouin, A., et al. (2018). CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron* 100, 120-134.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.017.
- Lévi, S., Schweizer, C., Bannai, H., Pascual, O., Charrier, C., and Triller, A. (2008). Homeostatic Regulation of Synaptic GlyR Numbers Driven by Lateral Diffusion. *Neuron* 59, 261–273. doi: 10.1016/j.neuron.2008.05.030.
- Leybaert, L., and Sanderson, M. J. (2012). Intercellular Ca<sup>2+</sup> Waves: Mechanisms and Function. *Physiol. Rev.* 92, 1359–1392. doi: 10.1152/physrev.00029.2011.
- Li, W., Ma, L., Yang, G., and Gan, W.-B. (2017). REM sleep selectively prunes and maintains new synapses in development and learning. *Nat. Neurosci.* 20, 427–437. doi: 10.1038/nn.4479.
- Li, Y., Du, X., Liu, C., Wen, Z., and Du, J. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell* 23, 1189–1202. doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.027.
- Li, Y., Zhang, W., Shi, R., Sun, M., Zhang, L., Li, N., et al. (2018). Prenatal Caffeine Damaged Learning and Memory in Rat Offspring Mediated by ARs/PKA/CREB/BDNF Pathway. *Physiol. Res.*, 975–983. doi: 10.33549/physiolres.933906.
- Li, Z., Van Aelst, L., and Cline, H. T. (2000). Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in Xenopus central neurons in vivo. *Nat. Neurosci.* 3, 217–225. doi: 10.1038/72920.
- Liao, D., Hessler, N. A., and Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375, 400–404. doi: 10.1038/375400a0.
- Lichtman, J. W., and Colman, H. (2000). Synapse Elimination and Indelible Memory. *Neuron* 25, 269–278. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80893-4.
- Lim, S.-H., Park, E., You, B., Jung, Y., Park, A.-R., Park, S. G., et al. (2013). Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS ONE* 8, e81218. doi: 10.1371/journal.pone.0081218.
- Lisman, J., Cooper, K., Sehgal, M., and Silva, A. J. (2018). Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nat. Neurosci.* 21, 309–314. doi: 10.1038/s41593-018-0076-6.
- Liu, S. J., and Cull-Candy, S. G. (2005). Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nat. Neurosci.* 8, 768–775. doi: 10.1038/nn1468.

- Liu, Y., Alahiri, M., Ulloa, B., Xie, B., and Sadiq, S. A. (2018). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist ameliorates EAE and correlates with Th1 cytokine-induced blood brain barrier dysfunction via suppression of MLCK signaling pathway. *Immun. Inflamm. Dis.* 6, 72–80. doi: 10.1002/iid3.187.
- Liu, Y., Given, K. S., Dickson, E. L., Owens, G. P., Macklin, W. B., and Bennett, J. L. (2019). Concentration-dependent effects of CSF1R inhibitors on oligodendrocyte progenitor cells ex vivo and in vivo. *Exp. Neurol.* 318, 32–41. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.04.011.
- Liu, Y., Zhou, L.-J., Wang, J., Li, D., Ren, W.-J., Peng, J., et al. (2017). TNF- $\alpha$  Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. *J. Neurosci.* 37, 871–881. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016.
- Lopatáň, J., Dale, N., and Frenguelli, B. G. (2015). Pannexin-1-mediated ATP release from area CA3 drives mGlu5-dependent neuronal oscillations. *Neuropharmacology* 93, 219–228. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.01.014.
- Lopes, C. R., Lourenço, V. S., Tomé, Â. R., Cunha, R. A., and Canas, P. M. (2021). Use of knockout mice to explore CNS effects of adenosine. *Biochem. Pharmacol.* 187, 114367. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114367.
- Lopes, J. P., Morató, X., Souza, C., Pinhal, C., Machado, N. J., Canas, P. M., et al. (2015). The role of parkinson's disease-associated receptor GPR37 in the hippocampus: functional interplay with the adenosinergic system. *J. Neurochem.* 134, 135–146. doi: 10.1111/jnc.13109.
- Lopes, J. P., Pliássova, A., and Cunha, R. A. (2019). The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.* 166, 313–321. doi: 10.1016/j.bcp.2019.06.008.
- Lopes, L. V., Cunha, R. A., Kull, B., Fredholm, B. B., and Ribeiro, J. A. (2002). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A<sub>1</sub> receptor inhibition. *Neuroscience* 112, 319–329. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00080-5.
- Lopes, L. V., Cunha, R. A., and Ribeiro, J. A. (1999). Cross Talk Between A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> Adenosine Receptors in the Hippocampus and Cortex of Young Adult and Old Rats. *J. Neurophysiol.* 82, 3196–3203. doi: 10.1152/jn.1999.82.6.3196.
- Lopes, L. V., Halldner, L., Rebola, N., Johansson, B., Ledent, C., Chen, J. F., et al. (2004). Binding of the prototypical adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist CGS 21680 to the cerebral cortex of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor knockout mice: CGS 21680 binding in adenosine receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 141, 1006–1014. doi: 10.1038/sj.bjp.0705692.
- Lopes, L. V., Rebola, N., Pinheiro, P. C., Richardson, P. J., Oliveira, C. R., and Cunha, R. A. (2003). Adenosine A<sub>3</sub> receptors are located in neurons of the rat hippocampus: *NeuroReport* 14, 1645–1648. doi: 10.1097/00001756-200308260-00021.
- Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N. A., Schnermann, J., et al. (2012). Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6265–6270. doi: 10.1073/pnas.1120997109.



- Luján, R., Nusser, Z., Roberts, J. D. B., Shigemoto, R., and Somogyi, P. (1996). Perisynaptic Location of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1488–1500. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01611.x.
- Lüthi, A., Schwyzer, L., Mateos, J. M., Gähwiler, B. H., and McKinney, R. A. (2001). NMDA receptor activation limits the number of synaptic connections during hippocampal development. *Nat. Neurosci.* 4, 1102–1107. doi: 10.1038/nn744.
- MacDonald, W. F., and White, T. D. (1985). Nature of Extrasynaptosomal Accumulation of Endogenous Adenosine Evoked by K<sup>+</sup> and Veratridine. *J. Neurochem.* 45, 791–797. doi: 10.1111/j.1471-4159.1985.tb04062.x.
- Madeira, M. H., Boia, R., Elvas, F., Martins, T., Cunha, R. A., Ambrósio, A. F., et al. (2016). Selective A2A receptor antagonist prevents microglia-mediated neuroinflammation and protects retinal ganglion cells from high intraocular pressure–induced transient ischemic injury. *Transl. Res.* 169, 112–128. doi: 10.1016/j.trsl.2015.11.005.
- Maenhaut, C., Van Sande, J., Libert, F., Abramowicz, M., Parmentier, M., Vanderhaegen, J.-J., et al. (1990). RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1169–1178. doi: 10.1016/S0006-291X(05)80909-X.
- Malinow, R., and Malenka, R. C. (2002). AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758.
- Manzoni, O. J., Manabe, T., and Nicoll, R. A. (1994). Release of Adenosine by Activation of NMDA Receptors in the Hippocampus. *Science* 265, 2098–2101. doi: 10.1126/science.7916485.
- Mariotti, L., and Tripodi, M. (2019). Looking at Synaptic Specificity from a Different Angle. *Neuron* 102, 1091–1093. doi: 10.1016/j.neuron.2019.05.046.
- Martire, A., Tebano, M. T., Chiodi, V., Ferreira, S. G., Cunha, R. A., Köfalvi, A., et al. (2011). Pre-synaptic adenosine A2A receptors control cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of striatal glutamatergic neurotransmission: Cross-talk between A2A and CB1 receptors in rat striatum. *J. Neurochem.* 116, 273–280. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07101.x.
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., et al. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 353, aad8670. doi: 10.1126/science.aad8670.
- Matos, M., Augusto, E., Agostinho, P., Cunha, R. A., and Chen, J.-F. (2013). Antagonistic Interaction between Adenosine A2A Receptors and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-2 Controlling Glutamate Uptake in Astrocytes. *J. Neurosci.* 33, 18492–18502. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1828-13.2013.
- Matos, M., Augusto, E., Machado, N. J., dos Santos-Rodrigues, A., Cunha, R. A., and Agostinho, P. (2012). Astrocytic Adenosine A2A Receptors Control the Amyloid- $\beta$  Peptide-Induced Decrease of Glutamate Uptake. *J. Alzheimers Dis.* 31, 555–567. doi: 10.3233/JAD-2012-120469.

- Matos, M., Shen, H.-Y., Augusto, E., Wang, Y., Wei, C. J., Wang, Y. T., et al. (2015). Deletion of Adenosine A2A Receptors From Astrocytes Disrupts Glutamate Homeostasis Leading to Psychomotor and Cognitive Impairment: Relevance to Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 78, 763–774. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.02.026.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766. doi: 10.1038/nature02617.
- Mazur, A., Bills, E. H., Henderson, B. J., and Risher, W. C. (2021). Astrocyte-derived thrombospondin induces cortical synaptogenesis in a sex-specific manner. *Neuroscience* doi: 10.1101/2021.01.04.425242.
- Melani, A., Cipriani, S., Vannucchi, M. G., Nosi, D., Donati, C., Bruni, P., et al. (2009). Selective adenosine A2a receptor antagonism reduces JNK activation in oligodendrocytes after cerebral ischaemia. *Brain* 132, 1480–1495. doi: 10.1093/brain/awp076.
- Menassa, D. A., and Gomez-Nicola, D. (2018). Microglial Dynamics During Human Brain Development. *Front. Immunol.* 9, 1014. doi: 10.3389/fimmu.2018.01014.
- Miao, Y., Chen, X., You, F., Jia, M., Li, T., Tang, P., et al. (2021). Adenosine A2A receptor modulates microglia-mediated synaptic pruning of the retinogeniculate pathway during postnatal development. *Neuropharmacology*, 108806. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108806.
- Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., et al. (2016). Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain. Behav. Immun.* 55, 114–125. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.024.
- Milojević, T., Reiterer, V., Stefan, E., Korkhov, V. M., Dorostkar, M. M., Ducza, E., et al. (2006). The Ubiquitin-Specific Protease Usp4 Regulates the Cell Surface Level of the A<sub>2a</sub> Receptor. *Mol. Pharmacol.* 69, 1083–1094. doi: 10.1124/mol.105.015818.
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., et al. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat. Commun.* 7, 12540. doi: 10.1038/ncomms12540.
- Miyamoto, A., Wake, H., Moorhouse, A. J., and Nabekura, J. (2013). Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front. Cell. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00070.
- Monday, H. R., Younts, T. J., and Castillo, P. E. (2018). Long-Term Plasticity of Neurotransmitter Release: Emerging Mechanisms and Contributions to Brain Function and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 41, 299–322. doi: 10.1146/annurev-neuro-080317-062155.
- Morató, X., Luján, R., López-Cano, M., Gandía, J., Stagljar, I., Watanabe, M., et al. (2017). The Parkinson's disease-associated GPR37 receptor interacts with striatal adenosine A2A receptor controlling its cell surface expression and function in vivo. *Sci. Rep.* 7, 9452. doi: 10.1038/s41598-017-10147-x.

- Morel, L., Higashimori, H., Tolman, M., and Yang, Y. (2014). VGLUT1+ Neuronal Glutamatergic Signaling Regulates Postnatal Developmental Maturation of Cortical Protoplasmic Astroglia. *J. Neurosci.* 34, 10950–10962. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1167-14.2014.
- Morini, R., Bizzotto, M., Perrucci, F., Filipello, F., and Matteoli, M. (2021). Strategies and Tools for Studying Microglial-Mediated Synapse Elimination and Refinement. *Front. Immunol.* 12, 640937. doi: 10.3389/fimmu.2021.640937.
- Moriyama, K., and Sitkovsky, M. V. (2010). Adenosine A2A Receptor Is Involved in Cell Surface Expression of A2B Receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 39271–39288. doi: 10.1074/jbc.M109.098293.
- Mouton, P. R., Long, J. M., Lei, D.-L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M. E., et al. (2002). Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res.*, 6.
- Müller, B. M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W. J., Kuhlendahl, S., Fenster, S. D., et al. (1996). SAP102, a Novel Postsynaptic Protein That Interacts with NMDA Receptor Complexes In Vivo. *Neuron* 17, 255–265. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80157-9.
- Murai, K. K., and Pasquale, E. B. (2011). Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses. *Glia* 59, 1567–1578. doi: 10.1002/glia.21226.
- Murphy, K., Gerzanich, V., Zhou, H., Ivanova, S., Dong, Y., Hoffman, G., et al. (2003). Adenosine-A2a Receptor Down-Regulates Cerebral Smooth Muscle L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Activity via Protein Tyrosine Phosphatase, Not cAMP-Dependent Protein Kinase. 10.
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J., Groc, L., and Oliet, S. H. R. (2017). Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission: Astroglial glutamate uptake. *J. Neurosci. Res.* 95, 2140–2151. doi: 10.1002/jnr.24029.
- Nagy, J. I., Geiger, J. D., and Daddona, P. E. (1985). Adenosine uptake sites in rat brain: Identification using [<sup>3</sup>H]nitrobenzylthioinosine and co-localization with adenosine deaminase. *Neurosci. Lett.* 55, 47–53. doi: 10.1016/0304-3940(85)90310-6.
- Nair, D., Hosy, E., Petersen, J. D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., et al. (2013). Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *J. Neurosci.* 33, 13204–13224. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013.
- Nakayama, H., Abe, M., Morimoto, C., Iida, T., Okabe, S., Sakimura, K., et al. (2018). Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. *Nat. Commun.* 9, 2830. doi: 10.1038/s41467-018-05100-z.
- Nascimento, F. P., Macedo-Júnior, S. J., Pamplona, F. A., Luiz-Cerutti, M., Córdova, M. M., Constantino, L., et al. (2015). Adenosine A1 Receptor-Dependent Antinociception Induced by Inosine in Mice: Pharmacological, Genetic and Biochemical Aspects. *Mol. Neurobiol.* 51, 1368–1378. doi: 10.1007/s12035-014-8815-5.
- Navarro, G., Hradsky, J., Lluís, C., Casadó, V., McCormick, P. J., Kreutz, M. R., et al. (2012). NCS-1 associates with adenosine A2A receptors and modulates receptor function. *Front. Mol. Neurosci.* 5. doi: 10.3389/fnmol.2012.00053.

- Nayeem, M. A., Pradhan, I., Mustafa, S. J., Morisseau, C., Falck, J. R., and Zeldin, D. C. (2013). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor modulates vascular response in soluble epoxide hydrolase-null mice through CYP-epoxygenases and PPAR $\gamma$ . *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R23–R32. doi: 10.1152/ajpregu.00213.2012.
- Newell, E. A., Exo, J. L., Verrier, J. D., Jackson, T. C., Gillespie, D. G., Janesko-Feldman, K., et al. (2015). 2',3'-cAMP, 3'-AMP, 2'-AMP and adenosine inhibit TNF- $\alpha$  and CXCL10 production from activated primary murine microglia via A<sub>2A</sub> receptors. *Brain Res.* 1594, 27–35. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.059.
- Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* 93, 281–290. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.015.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. 308, 6.
- Oh, W. C., Lutz, S., Castillo, P. E., and Kwon, H.-B. (2016). De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex. *Science* 353, 1037–1040. doi: 10.1126/science.aaf5206.
- Ohki, M., Sugiyama, K., Kawai, F., Tanaka, H., Nihei, Y., Unzai, S., et al. (2016). Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6659–6664. doi: 10.1073/pnas.1517520113.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2007). Involvement of P<sub>2X</sub><sub>4</sub> and P<sub>2Y</sub><sub>12</sub> receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 55, 604–616. doi: 10.1002/glia.20489.
- Ohsawa, K., Sanagi, T., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2012). Adenosine A<sub>3</sub> receptor is involved in ADP-induced microglial process extension and migration: A<sub>3</sub> receptor in microglial process extension. *J. Neurochem.* 121, 217–227. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07693.x.
- Okabe, S., Kim, H.-D., Miwa, A., Kuriu, T., and Okado, H. (1999). Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nat. Neurosci.* 2, 804–811. doi: 10.1038/12175.
- Olah, M. E. (1997). Identification of A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Domains Involved in Selective Coupling to GS. *J. Biol. Chem.* 272, 240–248. doi: 10.1074/jbc.272.1.240.
- Olah, M. E., and Stiles, G. L. (2000a). The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol. Ther.* 85, 55–75. doi: 10.1016/S0163-7258(99)00051-0.
- Olah, M. E., and Stiles, G. L. (2000b). The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol. Ther.* 85, 55–75. doi: 10.1016/S0163-7258(99)00051-0.
- Orr, A. G., Orr, A. L., Li, X.-J., Gross, R. E., and Traynelis, S. F. (2009). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* 12, 872–878. doi: 10.1038/nn.2341.
- O'Sullivan, M. L., de Wit, J., Savas, J. N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates, J. R., et al. (2012). FLRT Proteins Are Endogenous Latrophilin Ligands and Regulate Excitatory Synapse Development. *Neuron* 73, 903–910. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.018.

- Pan, F., and Gan, W.-B. (2008). Two-photon imaging of dendritic spine development in the mouse cortex. *Dev. Neurobiol.* 68, 771–778. doi: 10.1002/dneu.20630.
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* 146, 785–798. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.022.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O. A., and Verkhratsky, A. (2009). P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158, 137–148. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.076.
- Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 39–47. doi: 10.1016/j.coph.2006.08.011.
- Paolicelli, R. C., Bisht, K., and Tremblay, M.-Å. (2014). Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi: 10.3389/fncel.2014.00129.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., et al. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333, 1456–1458. doi: 10.1126/science.1202529.
- Papouin, T., Dunphy, J., Tolman, M., Foley, J. C., and Haydon, P. G. (2017). Astrocytic control of synaptic function. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160154. doi: 10.1098/rstb.2016.0154.
- Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. doi: 10.1038/nrn3379.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., et al. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155, 1596–1609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030.
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109. doi: 10.1073/pnas.1111098109.
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., et al. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 310, 113–116. doi: 10.1126/science.1116916.
- Patneau, K., and Mayer, L. (1990). Structure-Activity Relationships for Amino Acid Transmitter Candidates Acting at IV-Methylaspartate and Quisqualate Receptors. 15.
- Pelkey, K. A. (2015). Pentraxins Coordinate Excitatory Synapse Maturation and Circuit Integration of Parvalbumin Interneurons. *Neuron* 85, 38. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.020>.
- Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001.
- Perez de Arce, K., Schrod, N., Metzbower, S. W. R., Allgeyer, E., Kong, G. K.-W., Tang, A.-H., et al. (2015). Topographic Mapping of the Synaptic Cleft into Adhesive Nanodomains. *Neuron* 88, 1165–1172. doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.011.

- Perry, J. S. A., and Ravichandran, K. S. (2017). Embryonic Trophocytosis: Neighborly Nibbling during Development. *Curr. Biol.* 27, R68–R70. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.043.
- Perry, V. H., and O'Connor, V. (2008). C1q: the perfect complement for a synaptic feast? *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 807–811. doi: 10.1038/nrn2394.
- Pessac, B., Godin, I., and Alliot, F. (2001). Microglie : origine et développement – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. Available at: <https://www.academie-medecine.fr/microglie-origine-et-developpement/> [Accessed July 5, 2022].
- Petanjek, Z., Judaš, M., Šimić, G., Rašin, M. R., Uylings, H. B. M., Rakic, P., et al. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 13281–13286. doi: 10.1073/pnas.1105108108.
- Piccinin, S., Di Angelantonio, S., Piccioni, A., Volpini, R., Cristalli, G., Fredholm, B. B., et al. (2010). CX3CL1-induced modulation at CA1 synapses reveals multiple mechanisms of EPSC modulation involving adenosine receptor subtypes. *J. Neuroimmunol.* 224, 85–92. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.012.
- Pickering, M., Cumiskey, D., and O'Connor, J. J. (2005). Actions of TNF- $\alpha$  on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system: TNF- $\alpha$  and glutamate in the CNS. *Exp. Physiol.* 90, 663–670. doi: 10.1113/expphysiol.2005.030734.
- Piirainen, H., Hellman, M., Tossavainen, H., Permi, P., Kursula, P., and Jaakola, V.-P. (2015). Human Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Binds Calmodulin with High Affinity in a Calcium-Dependent Manner. *Biophys. J.* 108, 903–917. doi: 10.1016/j.bpj.2014.12.036.
- Popoli, P., and Peponi, R. (2012). Potential Therapeutic Relevance of Adenosine A<sub>2B</sub> and A<sub>2A</sub> Receptors in the Central Nervous System. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 11, 664–674. doi: 10.2174/187152712803581100.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M., Bjørkum, A. A., Greene, R. W., and McCarley, R. W. (1997). Adenosine: A Mediator of the Sleep-Inducing Effects of Prolonged Wakefulness. *Science* 276, 1265–1268. doi: 10.1126/science.276.5316.1265.
- Pradhan, J., Noakes, P. G., and Bellingham, M. C. (2019). The Role of Altered BDNF/TrkB Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 368. doi: 10.3389/fncel.2019.00368.
- Prange, O., and Murphy, T. H. (2001). Modular Transport of Postsynaptic Density-95 Clusters and Association with Stable Spine Precursors during Early Development of Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 21, 9325–9333. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-23-09325.2001.
- Preti, D., Baraldi, P. G., Moorman, A. R., Borea, P. A., and Varani, K. (2015). History and Perspectives of A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Antagonists as Potential Therapeutic Agents: A<sub>2A</sub> ADENOSINE RECEPTOR ANTAGONISTS. *Med. Res. Rev.* 35, 790–848. doi: 10.1002/med.21344.
- Quiroz, C., Luján, R., Uchigashima, M., Simoes, A. P., Lerner, T. N., Borycz, J., et al. (2009). Key Modulatory Role of Presynaptic Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors in Cortical Neurotransmission to the Striatal Direct Pathway. *Sci. World J.* 9, 1321–1344. doi: 10.1100/tsw.2009.143.

- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., et al. (2006). Chemokine Fractalkine/CX3CL1 Negatively Modulates Active Glutamatergic Synapses in Rat Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 26, 10488–10498. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006.
- Rajan, I., and Cline, H. T. (1998). Glutamate Receptor Activity Is Required for Normal Development of Tectal Cell Dendrites *In Vivo*. *J. Neurosci.* 18, 7836–7846. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-19-07836.1998.
- Rakic, P., Bourgeois, J.-P., Eckenhoff, M. F., Zecevic, N., and Goldman-Rakic, P. S. (1986). Concurrent Overproduction of Synapses in Diverse Regions of the Primate Cerebral Cortex. *Science* 232, 232–235. doi: 10.1126/science.3952506.
- Ransohoff, R. M., and Stevens, B. (2011). How Many Cell Types Does It Take to Wire a Brain? *Science* 333, 1391–1392. doi: 10.1126/science.1212112.
- Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R. A., and Mulle, C. (2008). Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* 57, 121–134. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.023.
- Rebola, N., Rodrigues, R. J., Lopes, L. V., Richardson, P. J., Oliveira, C. R., and Cunha, R. A. (2005). Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience* 133, 79–83. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.054.
- Rebola, N., Simões, A. P., Canas, P. M., Tomé, A. R., Andrade, G. M., Barry, C. E., et al. (2011). Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction: A2A receptors control neuroinflammation. *J. Neurochem.* 117, 100–111. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07178.x.
- Renner, M., Schweizer, C., Bannai, H., Triller, A., and Lévi, S. (2012). Diffusion Barriers Constrain Receptors at Synapses. *PLoS ONE* 7, e43032. doi: 10.1371/journal.pone.0043032.
- Rex, C. S., Lin, C.-Y., Kramar, E. A., Chen, L. Y., Gall, C. M., and Lynch, G. (2007). Brain-Derived Neurotrophic Factor Promotes Long-Term Potentiation-Related Cytoskeletal Changes in Adult Hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 3017–3029. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4037-06.2007.
- Ribeiro, F. F., Neves-Tomé, R., Assaife-Lopes, N., Santos, T. E., Silva, R. F. M., Brites, D., et al. (2016). Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A2A receptors activation in cerebral cortical neurons. *Brain Struct. Funct.* 221, 2777–2799. doi: 10.1007/s00429-015-1072-1.
- Ribeiro, J. A., Sebastião, A. M., and de Mendonça, A. (2002). Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 68, 377–392. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00155-7.
- Ricomagno, M. M., and Kolodkin, A. L. (2015). Sculpting Neural Circuits by Axon and Dendrite Pruning. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 779–805. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013038.

- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., et al. (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Neuron* 39, 5–15.
- Rivkees, S. A., and Wendler, C. C. (2017). Long-term consequences of disrupting adenosine signaling during embryonic development. *Mol. Aspects Med.* 55, 110–117. doi: 10.1016/j.mam.2017.02.001.
- Rodrigues, R. J., Marques, J. M., and Cunha, R. A. (2019). Purinergic signalling and brain development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 95, 34–41. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.12.001.
- Rosin, D. L., Robeva, A., Woodard, R. L., Guyenet, P. G., and Linden, J. (1998). Immunohistochemical localization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 401, 163–186. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981116)401:2<163::AID-CNE2>3.0.CO;2-D.
- Roumier, A. (2004). Impaired Synaptic Function in the Microglial KARAP/DAP12-Deficient Mouse. *J. Neurosci.* 24, 11421–11428. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2251-04.2004.
- Salmi, P., Chergui, K., and Fredholm, B. B. (2005). Adenosine–Dopamine Interactions Revealed in Knockout Mice. *J. Mol. Neurosci.* 26, 239–244. doi: 10.1385/JMN:26:2-3:239.
- Sando, R., Bushong, E., Zhu, Y., Huang, M., Considine, C., Phan, S., et al. (2017). Assembly of Excitatory Synapses in the Absence of Glutamatergic Neurotransmission. *Neuron* 94, 312–321.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.047.
- Sanes, J. R., and Zipursky, S. L. (2020). Synaptic Specificity, Recognition Molecules, and Assembly of Neural Circuits. *Cell* 181, 536–556. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.008.
- Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y.-X., Blahos, J., Hell, J. W., and Wenthold, R. J. (2000). A Developmental Change in NMDA Receptor-Associated Proteins at Hippocampal Synapses. *J. Neurosci.* 20, 1260–1271. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-03-01260.2000.
- Sanz-Clemente, A., Gray, J. A., Ogilvie, K. A., Nicoll, R. A., and Roche, K. W. (2013). Activated CaMKII Couples GluN2B and Casein Kinase 2 to Control Synaptic NMDA Receptors. *Cell Rep.* 3, 607–614. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.011.
- Sarantis, K., Tsiamaki, E., Kouvaros, S., Papatheodoropoulos, C., and Angelatou, F. (2015). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors permit mGluR5-evoked tyrosine phosphorylation of NR2B (Tyr1472) in rat hippocampus: a possible key mechanism in NMDA receptor modulation. *J. Neurochem.* 135, 714–726. doi: 10.1111/jnc.13291.
- Sato, S., Matsumura, H., and Hayaishi, O. (1998). Involvement of adenosine A<sub>2A</sub> receptor in sleep promotion. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 155–162. doi: 10.1016/S0014-2999(98)00302-1.
- Saura, J., Angulo, E., Ejarque, A., Casado, V., Tusell, J. M., Moratalla, R., et al. (2005). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J. Neurochem.* 95, 919–929. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03395.x.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., et al. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 5683–5686. doi: 10.1073/pnas.0800141105.



- Saxton, M. J., and Jacobson, K. (1997). SINGLE-PARTICLE TRACKING: Applications to Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 373–399. doi: 10.1146/annurev.biophys.26.1.373.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- Schafer, D. P., and Stevens, B. (2015). Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020545. doi: 10.1101/cshperspect.a020545.
- Scheefhals, N., and MacGillavry, H. D. (2018). Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 91, 82–94. doi: 10.1016/j.mcn.2018.05.002.
- Schmitz, S. K., King, C., Kortleven, C., Huson, V., Kroon, T., Schut, D., et al. (2016). Presynaptic inhibition upon CB1 or mGlu2/3 receptor activation requires ERK/MAPK phosphorylation of Munc18-1. *EMBO J.*, 15.
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Brecht, D. S., and Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 13902–13907. doi: 10.1073/pnas.172511199.
- Schulte, G., and Fredholm, B. B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* 15, 813–827. doi: 10.1016/S0898-6568(03)00058-5.
- Schwarz, J. M., Sholar, P. W., and Bilbo, S. D. (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain: Sex differences in microglial colonization. *J. Neurochem.*, no-no. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x.
- Scott-Hewitt, N., Perrucci, F., Morini, R., Erreni, M., Mahoney, M., Witkowska, A., et al. (2020). Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia. *EMBO J.* 39. doi: 10.15252/emboj.2020105380.
- Sebastiao, A. (1996). Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 48, 167–189. doi: 10.1016/0301-0082(95)00035-6.
- Sebastião, A. M., Assaife-Lopes, N., Diógenes, M. J., Vaz, S. H., and Ribeiro, J. A. (2011). Modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) actions in the nervous system by adenosine A2A receptors and the role of lipid rafts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1340–1349. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.028.
- Sebastião, A. M., and Ribeiro, J. A. (2015). Neuromodulation and metamodulation by adenosine: Impact and subtleties upon synaptic plasticity regulation. *Brain Res.* 1621, 102–113. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.008.
- Sebastiao, A., and Ribeiro, J. (2009). Tuning and Fine-Tuning of Synapses with Adenosine. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 180–194. doi: 10.2174/157015909789152128.
- Seidel, M. G., Klinger, M., Freissmuth, M., and Höller, C. (1999). Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by the A2A-adenosine Receptor via a rap1-dependent and via a p21-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 25833–25841. doi: 10.1074/jbc.274.36.25833.

- Serrano, A. (2006). GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression. *J. Neurosci.* 26, 5370–5382. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006.
- Shen, H.-Y., Coelho, J. E., Ohtsuka, N., Canas, P. M., Day, Y.-J., Huang, Q.-Y., et al. (2008). A Critical Role of the Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor in Extrastriatal Neurons in Modulating Psychomotor Activity as Revealed by Opposite Phenotypes of Striatum and Forebrain A<sub>2A</sub> Receptor Knock-Outs. *J. Neurosci.* 28, 2970–2975. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5255-07.2008.
- Shen, H.-Y., Huang, N., Reemmer, J., and Xiao, L. (2018). Adenosine Actions on Oligodendroglia and Myelination in Autism Spectrum Disorder. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 482. doi: 10.3389/fncel.2018.00482.
- Shen, W., Nikolic, L., Meunier, C., Pfrieder, F., and Audinat, E. (2017). An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation. *Sci. Rep.* 7, 11280. doi: 10.1038/s41598-017-11793-x.
- Sheng, C., Javed, U., Gibbs, M., Long, C., Yin, J., Qin, B., et al. (2018). Experience-dependent structural plasticity targets dynamic filopodia in regulating dendrite maturation and synaptogenesis. *Nat. Commun.* 9, 3362. doi: 10.1038/s41467-018-05871-5.
- Sheng, M., and Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. 6.
- Sheng, M., and Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005678–a005678. doi: 10.1101/cshperspect.a005678.
- Siddiqui, T. J., Tari, P. K., Connor, S. A., Zhang, P., Dobie, F. A., She, K., et al. (2013). An LRRTM4-HSPG Complex Mediates Excitatory Synapse Development on Dentate Gyrus Granule Cells. *Neuron* 79, 680–695. doi: 10.1016/j.neuron.2013.06.029.
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., and Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00006.
- Sigler, A., Oh, W. C., Imig, C., Altas, B., Kawabe, H., Cooper, B. H., et al. (2017). Formation and Maintenance of Functional Spines in the Absence of Presynaptic Glutamate Release. *Neuron* 94, 304-311.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.029.
- Silva, C. G., Métin, C., Fazeli, W., Machado, N. J., Darmopil, S., Launay, P.-S., et al. (2013). Adenosine Receptor Antagonists Including Caffeine Alter Fetal Brain Development in Mice. 13.
- Sim, R. B., Kishore, U., Villiers, C. L., Marche, P. N., and Mitchell, D. A. (2007). C1q binding and complement activation by prions and amyloids. *Immunobiology* 212, 355–362. doi: 10.1016/j.imbio.2007.04.001.
- Simões-Henriques, C., Mateus-Pinheiro, M., Gaspar, R., Pinheiro, H., Mendes Duarte, J., Baptista, F. I., et al. (2020). Microglia cytoarchitecture in the brain of adenosine A<sub>2A</sub> receptor knockout mice: Brain region and sex specificities. *Eur. J. Neurosci.* 51, 1377–1387. doi: 10.1111/ejn.14561.
- Smith, D. O. (1991). Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. *J. Physiol.* 432, 343–354. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018388.

- Smith, D. O., and Lu, Z. (1991). Adenosine derived from hydrolysis of presynaptically released ATP inhibits neuromuscular transmission in the rat. *Neurosci. Lett.* 122, 171–173. doi: 10.1016/0304-3940(91)90850-S.
- Sousa, C., Golebiewska, A., Poovathingal, S. K., Kaoma, T., Pires-Afonso, Y., Martina, S., et al. (2018). Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO Rep.* 19. doi: 10.15252/embr.201846171.
- Specht, C. G. (2013). Quantitative Nanoscopy of Inhibitory Synapses: Counting Gephyrin Molecules and Receptor Binding Sites. 14.
- Sperlágh, B., Heinrich, A., and Csölle, C. (2007). P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release—an update. *Purinergic Signal.* 3, 269–284. doi: 10.1007/s11302-007-9080-0.
- Sperlágh, B., and Vizi, S. E. (1996). Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Semin. Neurosci.* 8, 175–186. doi: 10.1006/smns.1996.0023.
- Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., et al. (2014). Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Rep.* 8, 1271–1279. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.042.
- Star, E. N., Kwiatkowski, D. J., and Murthy, V. N. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat. Neurosci.* 5, 239–246. doi: 10.1038/nn811.
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., et al. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131, 1164–1178. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036.
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., and Fields, R. D. (2002). Adenosine: A Neuron-Glial Transmitter Promoting Myelination in the CNS in Response to Action Potentials. 14.
- Stogsdill, J. A., Ramirez, J., Liu, D., Kim, Y. H., Baldwin, K. T., Enustun, E., et al. (2017). Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature* 551, 192–197. doi: 10.1038/nature24638.
- Südhof, T. C. (2012). The Presynaptic Active Zone. *Neuron* 75, 11–25. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.012.
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* 80, 675–690. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.022.
- Südhof, T. C. (2017). Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171, 745–769. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.024.
- Südhof, T. C. (2018). Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron* 100, 276–293. doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.040.
- Sun, C.-N., Cheng, H.-C., Chou, J., Lee, S.-Y., Lin, Y.-W., Lai, H.-L., et al. (2006). Rescue of p53 Blockage by the A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor via a Novel Interacting Protein, Translin-Associated Protein X. *Mol. Pharmacol.* 70, 454–466. doi: 10.1124/mol.105.021261.

- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *407*, 6.
- Taura, J., Valle-León, M., Sahlholm, K., Watanabe, M., Van Craenenbroeck, K., Fernández-Dueñas, V., et al. (2018). Behavioral control by striatal adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor heteromers. *Genes Brain Behav.* 17, e12432. doi: 10.1111/gbb.12432.
- Tay, T. L., Savage, J. C., Hui, C. W., Bisht, K., and Tremblay, M.-È. (2017). Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition: Microglia across the lifespan. *J. Physiol.* 595, 1929–1945. doi: 10.1113/JP272134.
- Tebano, M. T., Martire, A., Potenza, R. L., Grò, C., Pepponi, R., Armida, M., et al. (2007). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *J. Neurochem.* 0, 071116233414002-??? doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05046.x.
- Tebano, M. T., Martire, A., Rebola, N., Pepponi, R., Domenici, M. R., Gro, M. C., et al. (2005). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors and metabotropic glutamate 5 receptors are co-localized and functionally interact in the hippocampus: a possible key mechanism in the modulation of N-methyl-d-aspartate effects. *J. Neurochem.* 95, 1188–1200. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03455.x.
- Temido-Ferreira, M., Ferreira, D. G., Batalha, V. L., Marques-Morgado, I., Coelho, J. E., Pereira, P., et al. (2020). Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A<sub>2A</sub> receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. *Mol. Psychiatry* 25, 1876–1900. doi: 10.1038/s41380-018-0110-9.
- Tescarollo, F. C., Rombo, D. M., DeLiberto, L. K., Fedele, D. E., Alharfoush, E., Tomé, Â. R., et al. (2020). Role of Adenosine in Epilepsy and Seizures. *J. Caffeine Adenosine Res.* 10, 45–60. doi: 10.1089/caff.2019.0022.
- Théry, C., Stanley, E. R., and Mallat, M. (1992). Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulate the Production of Colony-Stimulating Factor 1 by Murine Astrocytes. *J. Neurochem.* 59, 1183–1186. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb08366.x.
- Thion, M. S., and Garel, S. (2018). Microglia Under the Spotlight: Activity and Complement-Dependent Engulfment of Synapses. *Trends Neurosci.* 41, 332–334. doi: 10.1016/j.tins.2018.03.017.
- Thion, M. S., Ginhoux, F., and Garel, S. (2018). Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science* 362, 185–189. doi: 10.1126/science.aat0474.
- Torti, M., Vacca, L., and Stocchi, F. (2018). Istradefylline for the treatment of Parkinson's disease: is it a promising strategy? *Expert Opin. Pharmacother.* 19, 1821–1828. doi: 10.1080/14656566.2018.1524876.
- Trapp, B. D., Wujek, J. R., Criste, G. A., Jalabi, W., Yin, X., Kidd, G. J., et al. (2007). Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55, 360–368. doi: 10.1002/glia.20462.
- Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., and Majewska, A. K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol.* 8, e1000527. doi: 10.1371/journal.pbio.1000527.

- Tremblay, M.-E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The Role of Microglia in the Healthy Brain. *J. Neurosci.* 31, 16064–16069. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011.
- Triller, A., and Choquet, D. (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci.* 28, 133–139. doi: 10.1016/j.tins.2005.01.001.
- Trincavelli, M. L., Costa, B., Tuscano, D., Lucacchini, A., and Martini, C. (2002). Up-regulation of A<sub>2A</sub> adenosine receptors by proinflammatory cytokines in rat PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 7.
- Tuan, L.-H., and Lee, L.-J. (2019). Microglia-mediated synaptic pruning is impaired in sleep-deprived adolescent mice. *Neurobiol. Dis.* 130, 104517. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104517.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., and Barres, B. A. (2001). Control of Synapse Number by Glia. *Science* 291, 657–661. doi: 10.1126/science.291.5504.657.
- Vainchtein, I. D., Chin, G., Cho, F. S., Kelley, K. W., Miller, J. G., Chien, E. C., et al. (2018). Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. *Science* 359, 1269–1273. doi: 10.1126/science.aal3589.
- Valdes-Aleman, J., Fetter, R. D., Sales, E. C., Heckman, E. L., Venkatasubramanian, L., Doe, C. Q., et al. (2021). Comparative Connectomics Reveals How Partner Identity, Location, and Activity Specify Synaptic Connectivity in *Drosophila*. *Neuron* 109, 105-122.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2020.10.004.
- van der Putten, C., Zuiderwijk-Sick, E. A., van Straalen, L., de Geus, E. D., Boven, L. A., Kondova, I., et al. (2009). Differential Expression of Adenosine A<sub>3</sub> Receptors Controls Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor-Mediated Inhibition of TLR Responses in Microglia. *J. Immunol.* 182, 7603–7612. doi: 10.4049/jimmunol.0803383.
- Van't Spijker, H. M., Rowlands, D., Rossier, J., Haenzi, B., Fawcett, J. W., and Kwok, J. C. F. (2019). Neuronal Pentraxin 2 Binds PNNs and Enhances PNN Formation. *Neural Plast.* 2019, 1–13. doi: 10.1155/2019/6804575.
- Varoqui, H., Schäfer, M. K.-H., Zhu, H., Weihe, E., and Erickson, J. D. (2002). Identification of the Differentiation-Associated Na<sup>+</sup>/IP<sub>1</sub> Transporter as a Novel Vesicular Glutamate Transporter Expressed in a Distinct Set of Glutamatergic Synapses. *J. Neurosci.* 22, 142–155. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00142.2002.
- Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., et al. (2000). Synaptic Assembly of the Brain in the Absence of Neurotransmitter Secretion. *Science* 287, 864–869. doi: 10.1126/science.287.5454.864.
- Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130595. doi: 10.1098/rstb.2013.0595.
- Villacres, E. C., Wu, Z., Hua, W., Nielsen, M. D., Watters, J. J., Yan, C., et al. (1995). Developmentally Expressed Ca<sup>2+</sup>-sensitive Adenylyl Cyclase Activity Is Disrupted in the Brains of Type I Adenylyl Cyclase Mutant Mice. *J. Biol. Chem.* 270, 14352–14357. doi: 10.1074/jbc.270.24.14352.

- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J. Neurosci.* 29, 3974–3980. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009.
- Wall, M. J., and Dale, N. (2013). Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus: Mechanisms of hippocampal adenosine release. *J. Physiol.* 591, 3853–3871. doi: 10.1113/jphysiol.2013.253450.
- Wang, C., Yue, H., Hu, Z., Shen, Y., Ma, J., Li, J., et al. (2020). Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science* 367, 688–694. doi: 10.1126/science.aaz2288.
- Wang, H., Westin, L., Nong, Y., Birnbaum, S., Bendor, J., Brismar, H., et al. (2009). Norbin Is an Endogenous Regulator of Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling. *Science* 326, 1554–1557. doi: 10.1126/science.1178496.
- Wang, S.-J. (2003). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 469, 47–55. doi: 10.1016/S0014-2999(03)01734-5.
- Washbourne, P., Bennett, J. E., and McAllister, A. K. (2002). Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat. Neurosci.* 5, 751–759. doi: 10.1038/nn883.
- Wayman, G. A., Wei, J., Wong, S., and Storm, D. R. (1996). Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6075–6082. doi: 10.1128/MCB.16.11.6075.
- Weinhard, L., di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N. L., Neniskyte, U., et al. (2018). Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat. Commun.* 9, 1228. doi: 10.1038/s41467-018-03566-5.
- Welihinda, A. A., Kaur, M., Greene, K., Zhai, Y., and Amento, E. P. (2016). The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor with a unique signaling bias. *Cell. Signal.* 28, 552–560. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.02.010.
- Wilson Horch, H., Krüttgen, A., Portbury, S. D., and Katz, L. C. (1999). Destabilization of Cortical Dendrites and Spines by BDNF. *Neuron* 23, 353–364. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80785-0.
- Witting, A., Müller, P., Herrmann, A., Kettenmann, H., and Nolte, C. (2002). Phagocytic Clearance of Apoptotic Neurons by Microglia/Brain Macrophages In Vitro: Involvement of Lectin-, Integrin-, and Phosphatidylserine-Mediated Recognition. *J. Neurochem.* 75, 1060–1070. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0751060.x.
- Woods, A. S., Marcellino, D., Jackson, S. N., Franco, R., Ferré, S., Agnati, L. F., et al. (2008). How Calmodulin Interacts with the Adenosine A<sub>2A</sub> and the Dopamine D<sub>2</sub> Receptors. *J. Proteome Res.* 7, 3428–3434. doi: 10.1021/pr8001782.
- Wu, D., Bacaj, T., Morishita, W., Goswami, D., Arendt, K. L., Xu, W., et al. (2017). Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP. *Nature* 544, 316–321. doi: 10.1038/nature21720.

- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., and Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* 36, 605–613. doi: 10.1016/j.it.2015.08.008.
- Wu, Z. L., Thomas, S. A., Villacres, E. C., Xia, Z., Simmons, M. L., Chavkin, C., et al. (1995). Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 220–224. doi: 10.1073/pnas.92.1.220.
- Xiong, Y., Teng, S., Zheng, L., Sun, S., Li, J., Guo, N., et al. (2018). Stretch-induced Ca<sup>2+</sup> independent ATP release in hippocampal astrocytes: Non-vesicular ATP release in a stimulated astrocyte. *J. Physiol.* 596, 1931–1947. doi: 10.1113/JP275805.
- Yee, A. X., Hsu, Y.-T., and Chen, L. (2017). A metaplasticity view of the interaction between homeostatic and Hebbian plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160155. doi: 10.1098/rstb.2016.0155.
- Yim, Y. S., Kwon, Y., Nam, J., Yoon, H. I., Lee, K., Kim, D. G., et al. (2013). Slitrks control excitatory and inhibitory synapse formation with LAR receptor protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4057–4062. doi: 10.1073/pnas.1209881110.
- Young, A., Ngiow, S. F., Barkauskas, D. S., Sult, E., Hay, C., Blake, S. J., et al. (2016). Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell* 30, 391–403. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.025.
- Young, J. D., Yao, S. Y. M., Sun, L., Cass, C. E., and Baldwin, S. A. (2008). Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* 38, 995–1021. doi: 10.1080/00498250801927427.
- Yu, L., Shen, H.-Y., Coelho, J. E., Araújo, I. M., Huang, Q.-Y., Day, Y.-J., et al. (2008). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists exert motor and neuroprotective effects by distinct cellular mechanisms. *Ann. Neurol.* 63, 338–346. doi: 10.1002/ana.21313.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 24–34. doi: 10.1038/nrn1300.
- Zappettini, S., Faivre, E., Ghestem, A., Carrier, S., Buée, L., Blum, D., et al. (2019). Caffeine Consumption During Pregnancy Accelerates the Development of Cognitive Deficits in Offspring in a Model of Tauopathy. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 438. doi: 10.3389/fncel.2019.00438.
- Zeuzala, J., and Freissmuth, M. (2008). The A<sub>2A</sub>-adenosine receptor: a GPCR with unique features?: The A<sub>2A</sub>-adenosine receptor. *Br. J. Pharmacol.* 153, S184–S190. doi: 10.1038/sj.bjp.0707674.
- Zhai, R. G., Vardinon-Friedman, H., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E. D., Ziv, N. E., et al. (2001). Assembling the Presynaptic Active Zone: A Characterization of an Active Zone Precursor Vesicle. 13.
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* 17, 400–406. doi: 10.1038/nn.3641.

- Zhang, L. I., and Poo, M. (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nat. Neurosci.* 4, 1207–1214. doi: 10.1038/nn753.
- Zhang, P., Lu, H., Peixoto, R. T., Pines, M. K., Ge, Y., Oku, S., et al. (2018). Heparan Sulfate Organizes Neuronal Synapses through Neurexin Partnerships. *Cell* 174, 1450-1464.e23. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.002.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., et al. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 945–953. doi: 10.1038/ncb1620.
- Zhao, W., Ma, L., Cai, C., and Gong, X. (2019). Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF- $\kappa$ B and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. *Int. J. Biol. Sci.* 15, 1571–1581. doi: 10.7150/ijbs.34211.
- Zheng, C. Y., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Kachar, B., and Wenthold, R. J. (2010). SAP102 Is a Highly Mobile MAGUK in Spines. *J. Neurosci.* 30, 4757–4766. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6108-09.2010.
- Zhou, Q. Y., Li, C., Olah, M. E., Johnson, R. A., Stiles, G. L., and Civelli, O. (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 7432–7436. doi: 10.1073/pnas.89.16.7432.
- Zhou, Y., Lai, C. S. W., Bai, Y., Li, W., Zhao, R., Yang, G., et al. (2020). REM sleep promotes experience-dependent dendritic spine elimination in the mouse cortex. *Nat. Commun.* 11, 4819. doi: 10.1038/s41467-020-18592-5.
- Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y., and Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat. Neurosci.* 3, 1098–1106. doi: 10.1038/80614.
- Zimmermann, H. (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17, 420–426. doi: 10.1016/0166-2236(94)90016-7.
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 299–309. doi: 10.1007/s002100000309.
- Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., and Heine, P. (1998). New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* 32, 421–425. doi: 10.1016/S0197-0186(97)00126-5.
- Zimmermann, H., Zebisch, M., and Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 8, 437–502. doi: 10.1007/s11302-012-9309-4.
- Zou, D.-J., and Cline, H. T. (1999). Postsynaptic Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Is Required to Limit Elaboration of Presynaptic and Postsynaptic Neuronal Arbors. *J. Neurosci.* 19, 8909–8918. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-20-08909.1999.