

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES..... 16

I. INTRODUCTION..... 23

A. La maladie d'Alzheimer 23

- 1) Les signes histopathologiques de la MA..... 23
 - a) *L'atrophie cérébrale* 23
 - b) *Les dégénérescences neurofibrillaires* 24
 - c) *Les plaques séniles*..... 25
- 2) Les associations pangénomiques et les mutations génétiques associées à la MA 26
 - a) *Le clivage de l'APP : PSEN1, PSEN2 et ADAM10*..... 27
 - b) *APOE et métabolisme du cholestérol* 27
 - c) *Réponse immunitaire* 27
 - d) *Endocytose* 27
- 3) La MA, une synaptopathie..... 28
- 4) La MA, une maladie "métabolique" 29

B. Les interactions entre neurones et astrocytes en conditions physiologiques et pathologiques 30

- 1) Organisation, morphologie et fonction des astrocytes 30
 - a) *En condition physiologique* 30
 - b) *En condition pathologique*..... 32
- 2) Les interactions neurones-astrocytes 33
 - a) *Régulation des flux ioniques*..... 33
 - b) *Défenses anti-oxydantes* 35
 - c) *Régulation du flux sanguin et de la BBB*..... 35
 - d) *Intégrité de la BBB et flux sanguin dans la MA*..... 38
 - e) *Support métabolique des neurones*..... 38
 - f) *Maintien de l'homéostasie glutamatergique*..... 43
 - g) *La synapse tripartite et la régulation de la transmission synaptique* 44
 - h) *Sérine: production et libération* 45

II. MATERIEL ET METHODES 51

A. Le modèle de souris 3xTg-AD..... 51

- 1) Les modèles murins de la MA 51
- 2) Les souris 3xTg-AD utilisées lors de ce projet 52
- 3) Génotypage 52

B. Etude du métabolisme cérébral par autoradiographie.....	53
1) Principe	53
2) Protocole	53
C. Histologie	55
1) Fixation et coupe des tissus	55
2) Marquages immuno-histochimiques	55
3) Marquages immuno-fluorescents	56
D. Quantification des marquages immuno-fluorescents et analyse de Sholl	56
1) Quantification de la valeur moyenne des marquages	56
2) Analyse de Sholl et quantification de l'expression de la PHGDH.....	57
E. Biochimie.....	58
1) Extraction des protéines	58
2) Western blot.....	58
F. Biologie moléculaire	59
1) Extraction ARN.....	59
2) Synthèse ADNc.....	59
3) Real time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)	59
4) Génération des plasmides	60
a) <i>La stratégie Gateway</i>	61
b) <i>Les plasmides d'entrée</i>	61
c) <i>Les plasmides de destination</i>	62
d) <i>Les plasmides AAV</i>	62
5) Production des AAVs	63
G. Injections stéréotaxiques	63
H. Enregistrements électrophysiologiques.....	64
1) Préparation des tranches	64
2) Enregistrements électrophysiologiques.....	64
3) Analyse des données	65
I. Enregistrements FRET	65
1) Préparation des tranches	65
2) Enregistrements du signal FRET	65
3) Analyse de données	66
J. Electrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser (EC-LIF)	67
1) Extraction des échantillons de cerveaux.....	67
2) Dérivation et dosage de la L-/D-sérine des échantillons	67

I. Analyses statistiques	67
---------------------------------------	-----------

III. RESULTATS 73

A. Caractérisation des souris 3xTg-AD : un modèle de la maladie d'Alzheimer	73
1) Caractérisation génétique des souris	73
2) Caractérisation immuno-histologique des souris 3xTg-AD	74
a) <i>Choix des anticorps.....</i>	<i>74</i>
b) <i>Les différences entre les mâles et les femelles 3xTg-AD.....</i>	<i>75</i>
c) <i>Caractérisation histopathologique des souris femelles 3xTg-AD dans différentes régions cérébrales.....</i>	<i>77</i>
3) Caractérisation de l'inflammation des souris 3xTg-AD	79
a) <i>Etude par immuno-fluorescence de l'activation astrocytaire et microgliale</i>	<i>79</i>
b) <i>Analyse de Sholl pour l'étude de l'activation astrocytaire.....</i>	<i>80</i>
c) <i>Etude par analyse de Sholl de l'activation astrocytaire des 3xTg-AD</i>	<i>82</i>
4) Caractérisation fonctionnelle des souris femelles 3xTg-AD.....	85
B. Exploration des déficits synaptiques	87
1) Les altérations de la LTP observées chez les 3xTg-AD sont restaurées par l'ajout de D-sérine..	87
2) Les quantités de L-/D-sérine sont modifiées dans l'hippocampe des souris de 6 mois.....	88
3) L'expression de la SRR n'est pas modifiée dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD	88
4) L'expression globale de la PHGDH n'est pas altérée dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD	89
a) <i>La 3-PHGDH est une enzyme astrocytaire.....</i>	<i>89</i>
b) <i>L'expression du transcrit de la PHGDH n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD.....</i>	<i>91</i>
c) <i>L'expression de la protéine PHGDH n'est pas altérée chez les souris 3xTg-AD</i>	<i>92</i>
5) L'influence de la morphologie des astrocytes sur l'expression de l'enzyme PHGDH	93
a) <i>La morphologie des astrocytes n'influence pas l'expression de la PHGDH entre les 3xTg-AD et les WT</i>	<i>93</i>
b) <i>L'enzyme PHGDH de l'hippocampe est exprimée de manière différentielle entre les 3xTg-AD et les WT</i>	<i>93</i>
6) Etude de l'expression d'un transporteur de la L-/D-sérine dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD	96
C. Altérations métaboliques précoces des souris 3xTg-AD par étude <i>in vivo</i> du métabolisme cérébral.....	98
1) Etude des paramètres physiologiques des 3xTg-AD: poids et glycémie	98
2) Etude du métabolisme cérébral des souris 3xTg-AD par autoradiographie	99
D. Etude du métabolisme cérébral à l'échelle cellulaire par utilisation de sondes FRET	102
1) Développement de vecteurs viraux s'exprimant dans des types cellulaires spécifiques.....	102
a) <i>Ciblage cellulaire spécifique des AAVs.....</i>	<i>102</i>

<i>b) Les vecteurs viraux ne provoquent pas de réaction inflammatoire du cerveau</i>	<i>103</i>
2) Expression des sondes FRET dans différents types cellulaires.....	104
3) Enregistrements FRET : résultats préliminaires.....	105
IV. DISCUSSION	109
A. Le modèle de souris 3xTg-AD.....	109
1) Caractérisation des pathologies amyloïde et tau des souris 3xTg-AD	109
2) La réactivité astrocytaire	110
B. La D-sérine : un acide aminé essentiel à la transmission synaptique.....	113
1) Etude de la production de D-sérine	113
<i>a) La SRR : localisation, expression et activité.....</i>	<i>113</i>
<i>b) La PHGDH : localisation, expression et activité</i>	<i>115</i>
<i>c) Les autres enzymes impliquées dans le métabolisme de la L-/D-sérine.....</i>	<i>117</i>
2) Libération de L-/D-sérine	118
<i>a) Les transporteurs des acides aminés neutres</i>	<i>119</i>
<i>b) Libération vésiculaires de la D-sérine</i>	<i>120</i>
C. Le métabolisme énergétique : implication dans la production de D-sérine	121
1) L'amyloïde- β : perturbateur du métabolisme énergétique ?	121
2) Etude du métabolisme avec une résolution spatiale élevée	122
D. Modèle proposé.....	124
V. CONCLUSION GENERALE	126
VI. ANNEXES	131
A. Abréviations	131
B. Résumé des régions hyper- et hypométaboliques	133
C. Publications & communications	134
Oral Communications	134
Posters	134
List of Publications	134
Publication 1: Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors.....	137
Publication 2: Channel-Mediated Lactate Release by K+-Stimulated Astrocytes.	153

Publication 3: Astrocytic 3-phosphoglycerate dehydrogenase links energy metabolism and LTP deficits in a mouse model of Alzheimer's Disease.	167
E. Références	197



TABLE DES FIGURES

Figure 1. L'atrophie de l'hippocampe est un marqueur de la MA.....	24
Figure 2. La protéine tau et ses différents états d'agrégation.	25
Figure 3. La voie amyloïdogénique : clivage de la protéine APP et production du peptide amyloïde- β	26
Figure 4. Perte synaptique chez les patients atteints de la MA.	28
Figure 5. Les régions cérébrales montrant un hypométabolisme chez les patients atteints de la MA identifiées par FDG-PET.	29
Figure 6. Morphologie et caractéristiques des astrocytes.....	31
Figure 7. Réactivité des astrocytes entourant les plaques amyloïdes.	33
Figure 8. Les astrocytes sont indispensables à la régulation de l'homéostasie cérébrale.	34
Figure 9. Les astrocytes sont impliqués dans la régulation et le maintien de l'intégrité de la BBB.	36
Figure 10. Les astrocytes participent au couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin.	37
Figure 11. Dernier modèle résumant la distribution de la consommation d'énergie autre que la communication neuronale.	39
Figure 12. Le couplage neuro-métabolique nécessite les astrocytes.	40
Figure 13. Implication du potassium et du glycogène dans l'ANLS.	41
Figure 14. Régulation de la glycolyse dans les neurones et les astrocytes.....	42
Figure 15. Voies de production de la L-/D-sérine et de la glycine.	46
Figure 16. Génération des souris 3xTg-AD par micro-injection de transgènes codant pour tau _{P301L} et APP _{SWE}	51
Figure 17. Schéma explicatif de la reconstruction 3D des volumes anatomique et autoradiographique à partir des coupes histologiques et des films autoradiographiques.	54
Figure 18. Liste des anticorps et de leur dilution pour les IHC, IF et WB.	56
Figure 19. Analyse de Sholl à partir d'un marquage GFAP et mesure de l'expression de la PHGDH.	57
Figure 20. Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR.....	60
Figure 21. Composition d'un plasmide AAV.....	60
Figure 22. Le système Gateway simple de recombinaison homologue entre plasmides.	61
Figure 23. Les plasmides générés et utilisés en combinaison grâce au système Gateway.....	62
Figure 24. Les plasmides AAV générés exprimant la td-Tomato ou des sondes FRET sensibles à différents métabolites.	63
Figure 25. Schéma d'une sonde FRET sensible au glucose.	66
Figure 26. La PCR montrant l'expression de la protéine PS1 mutée seulement chez les souris 3xTg-AD et la protéine humaine APP.....	73
Figure 27. Schéma représentant les anticorps 4G8 et OC ainsi que leur site de reconnaissance du peptide amyloïde- β	74
Figure 28. Schéma représentant les anticorps HT7, AT8, AT180 et AT100 et les épitopes de la protéine tau avec lesquels ils interagissent.	75

Figure 29. Les femelles 3xTg-AD présentent une pathologie amyloïde plus prononcée que les mâles.	76
Figure 30. Schéma des coupes sagittales.	76
Figure 31. Expression d'amyloïde dans l'hippocampe, le subiculum et l'amygdale des souris femelles 3xTg-AD.	77
Figure 32. Expression de tau hyperphosphorylée dans le subiculum et l'hippocampe des souris femelles 3xTg-AD.	78
Figure 33. Expression des marqueurs GFAP et IBA1 dans le CA1 et le subiculum des souris 3xTg-AD.	79
Figure 34. Analyse de Sholl et les indices obtenus.	80
Figure 35. Les différents index de l'analyse de Sholl sont corrélés à l'expression de la GFAP.	81
Figure 36. Distribution de l'index de ramification (IR) des astrocytes des souris 3xTg-AD.	83
Figure 37. Distribution de la superficie des astrocytes des souris 3xTg-AD.	84
Figure 38. Les souris 3xTg-AD présentent des déficits synaptiques dans le CA1 dès 7 mois.	86
Figure 39. L'ajout de D-sérine permet de restaurer la mise en place de la LTP chez les souris 3xTg-AD dans la région CA1.	87
Figure 40. Dosage de la L-/D-sérine cérébrale des souris de 6 mois.	88
Figure 41. L'expression protéique de l'enzyme SRR n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD à 6 et 12 mois.	89
Figure 42. L'expression de l'enzyme PHGDH dans les différents types cellulaires.	90
Figure 43. La PHGDH est faiblement exprimée dans les cellules microgliales.	90
Figure 44. Expression de la PHGDH dans l'hippocampe.	91
Figure 45. L'expression de l'ARNm de la PHGDH dans l'hippocampe et le subiculum.	91
Figure 46. L'expression protéique de l'enzyme PHGDH dans l'hippocampe et le subiculum.	92
Figure 47. L'index de ramification et la superficie des astrocytes ne sont pas corrélés à leur expression de PHGDH.	93
Figure 48. Distribution de l'expression de la PHGDH des astrocytes des souris 3xTg-AD.	94
Figure 49. Illustration de la plus grande hétérogénéité d'expression de la PHGDH dans le subiculum des souris 3xTg-AD.	95
Figure 50. L'expression du transporteur astrocytaire de la L-/D-sérine ASCT1 n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD.	96
Figure 51. Les souris 3xTg-AD âgées de 6 mois ont une glycémie inférieure à celle des contrôles mais un poids équivalent.	98
Figure 52. Les souris 3xTg-AD âgées de 12 mois ont une glycémie inférieure à celle des contrôles.	98
Figure 53. Altération de la consommation de glucose chez les souris 3xTg-AD par rapport aux contrôles.	99
Figure 54. Diminution de la consommation de glucose dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD.	100
Figure 55. Les clusters hypométaboliques de l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées de 6 mois.	100
Figure 56. Les clusters hypométaboliques de l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées de 12 mois.	101
Figure 57. Les vecteurs viraux développés ciblent spécifiquement les astrocytes ou les neurones.	102

Figure 58. L'injection et l'expression des vecteurs viraux développés ne provoquent pas d'activation des tissus.....	103
Figure 59. Expression des sondes FRET in vivo.	104
Figure 60. Enregistrement de la sonde FRET sensible au glucose dans des tranches de souris.....	105
Figure 61. Expression de la GFP dans les neurones et de la td-Tomato dans les astrocytes.	111
Figure 62. Expression de la SRR et de la GFAP dans la région CA1 de souris contrôle.	113
Figure 63. Schéma hypothétique de la production et du transport de L-sérine et D-sérine entre les neurones et les astrocytes.....	117

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

A. La maladie d'Alzheimer

La démence affecte la mémoire, le raisonnement, le comportement des personnes ainsi que leur aptitude à réaliser des tâches quotidiennes. Aujourd'hui, plus de 35 millions de personnes sont atteintes de démence dans le monde et, selon la plupart des études épidémiologiques, ce chiffre devrait tripler d'ici 2050 (World Alzheimer Report 2015, ADI). Cependant, un article récent regroupant plusieurs études épidémiologiques a reconsidéré la prévalence de développer une démence au sein des populations européennes. Les auteurs observent une stabilisation, voire une légère diminution de la prévalence des cas de démences en Europe au cours des vingt dernières années par rapport aux prédictions de l'époque (Wu et al., 2015). Ils mettent en avant les changements sociétaux (éducation, conditions de vie, moyens de prévention mis en place) qui impactent positivement la santé de la population. Cette stabilisation de la prévalence dans certains pays européens ne semble pas concerner les pays d'Afrique et d'Asie où, au contraire, une augmentation de la prévalence est prévue pour les années à venir.

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus fréquente, représentant environ 70% des cas. Elle a été décrite pour la première par Alois Alzheimer, psychiatre et neuropathologiste allemand, en 1906 après la mort d'une patiente atteinte de démence. Alois Alzheimer procède à une analyse histologique de son cerveau ce qui lui permet d'identifier des lésions spécifiques (Graeber and Mehraein, 1999). En 1911, à la découverte d'un deuxième cas, le psychiatre Emil Kraepelin propose de désigner ce type de démence "maladie d'Alzheimer" (MA).

1) Les signes histopathologiques de la MA

La majorité des cas de MA sont d'origine sporadique mais il existe des formes familiales se déclarant de façon précoce (avant 60 ans). Il a été identifié trois gènes dont les mutations sont impliquées dans le développement de la forme familiale de la MA. L'identification de ces gènes et de la forme familiale de la MA a permis la génération des premiers modèles animaux, accélérant l'étude de cette maladie.

A l'origine, la MA a été caractérisée par des études histologiques post-mortem qui ont révélé trois types de lésions : l'atrophie cérébrale, les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires.

a) L'atrophie cérébrale

Les études de tissus post-mortem de patients atteints de la MA ont révélé une atrophie cérébrale de certaines zones du cerveau. Les régions les plus touchées par cette atrophie sont le cortex entorhinal, l'hippocampe ou encore l'amygdale (de la Monte, 1989). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a permis l'étude longitudinale de l'atrophie cérébrale de personnes risquant de développer la MA (**Figure 1**). L'atrophie démarre dans les lobes temporaux, se poursuit dans les lobes pariétaux puis dans le lobe frontal (Whitwell, 2010). Cette atrophie cérébrale est causée par une perte importante de neurones et de synapses dans ces régions (Whitehouse et al., 1982, Bondareff et al., 1989).

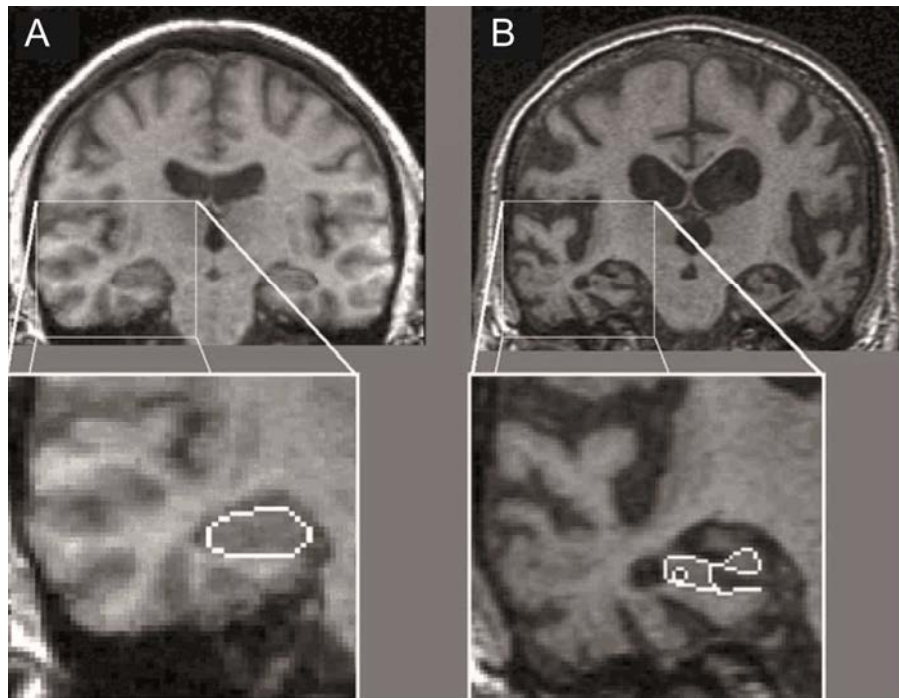


Figure 1. L'atrophie de l'hippocampe est un marqueur de la MA.

Imagerie par résonance magnétique montrant **A.** un sujet sain et **B.** un patient atteint de la MA. L'hippocampe est entouré de blanc afin d'aider à la visualisation de son atrophie chez les patient MA. Figure modifiée à partir de (Mosconi, 2005).

b) Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont des lésions composées d'agrégats de la protéine tau anormalement phosphorylée qui s'accumulent dans le corps cellulaire des neurones (**Figure 2**). La protéine tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP). Elle interagit avec les microtubules via ses domaines de liaison. Elle est fortement exprimée dans les neurones, particulièrement dans les axones (Binder et al., 1985).

En plus des neurones, le cerveau est composé des cellules gliales regroupant les astrocytes, les cellules microgliales et les oligodendrocytes. Ces cellules gliales, au départ moins étudiées, sont maintenant reconnues comme étant des acteurs majeurs de la plupart des fonctions cérébrales. Leur rôle dans le cadre de la MA est de plus en plus étudié. Dans certaines tauopathies, la protéine tau est retrouvée dans les astrocytes et les oligodendrocytes (Nishimura et al., 1992, Feany and Dickson, 1995, Komori et al., 1998). Cependant aucune étude n'a montré son expression dans les astrocytes de patients atteints de la MA.

En condition physiologique, tau est une protéine soluble permettant la stabilisation des microtubules en promouvant l'assemblage de la tubuline (Cleveland et al., 1977) et la régulation du transport axonal. Elle possède 84 sites potentiels de phosphorylation qui permettent de moduler son activité. En condition pathologique, la protéine tau est anormalement phosphorylée, perd sa propriété de solubilité et forme des structures filamenteuses (**Figure 2**). La protéine tau hyperphosphorylée n'interagit plus

correctement avec les microtubules (Biernat et al., 1993, Bramblett et al., 1993) et s'accumule dans les compartiments somato-dendritiques pour former des agrégats puis des DNF (Kowall and Kosik, 1987).

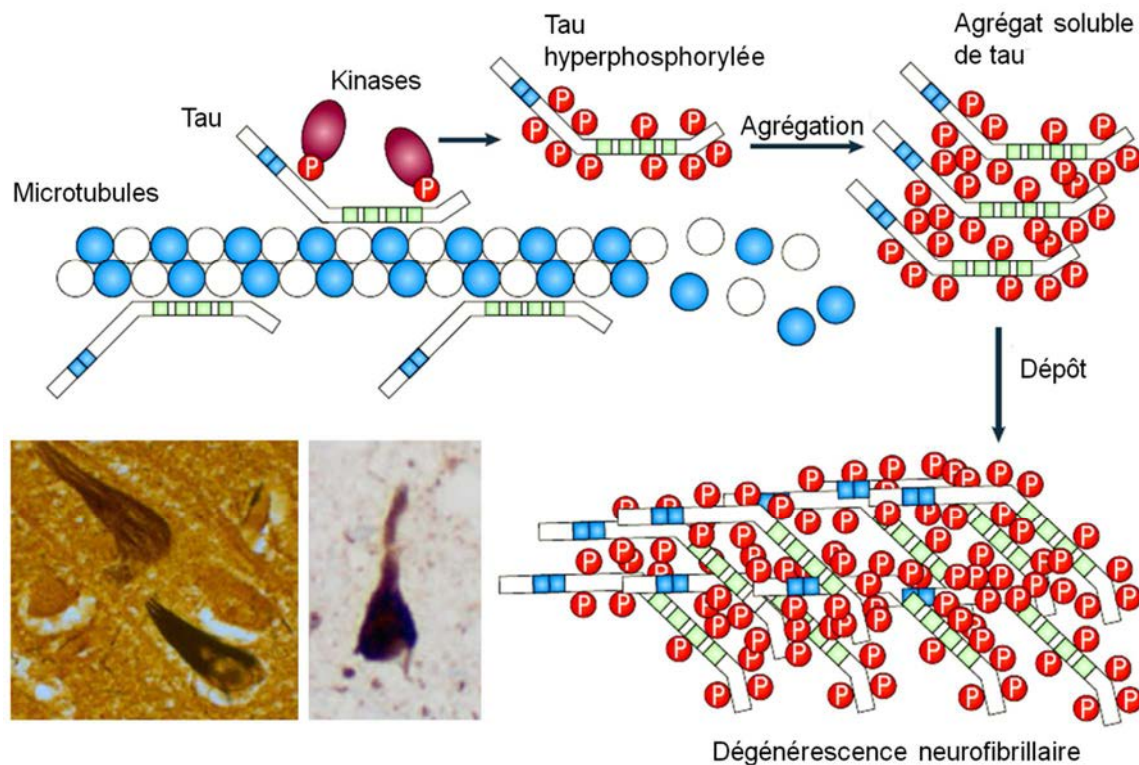


Figure 2. La protéine tau et ses différents états d'agrégation.

La protéine tau est associée aux microtubules (MT) et peut être phosphorylée par différentes kinases. Son hyperphosphorylation empêche son interaction avec les MT et conduit à son agrégation jusqu'à la formation de dégénérescence neurofibrillaire. Figure adaptée de (Gotz and Ittner, 2008, Santa-Maria et al., 2012).

c) Les plaques séniles

Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires dus à l'accumulation d'une protéine appelée amyloïde- β ($A\beta$) selon une conformation en feuillet β . La protéine $A\beta$ dérive de la protéolyse de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). L'APP peut être clivée par deux voies impliquant différentes enzymes protéolytiques: la voie amyloïdogénique qui conduit à la formation d' $A\beta$ et la voie non-amyloïdogénique (**Figure 3**) qui ne permet pas la production du peptide amyloïde (Haass and de Strooper, 1999).

Cette vision binaire du clivage de l'APP s'est récemment enrichie, notamment avec la découverte de la η -sécrétase. Alors que le peptide $A\beta$ a été pointé du doigt depuis longtemps comme étant le peptide participant à la pathologie de la MA, cette η -sécrétase introduit la production d'un nouveau peptide à partir de l'APP : le peptide amyloïde- η . Ce peptide, présent dans les cerveaux des patients atteints de la MA, perturbe la transmission synaptique (Willem et al., 2015). Ces données récentes démontrent la complexité des mécanismes de "processing" de l'APP dans le cerveau. Nous ne savons pas encore si ces mécanismes diffèrent selon le type cellulaire (neurone, cellules gliales) et la région cérébrale observée.

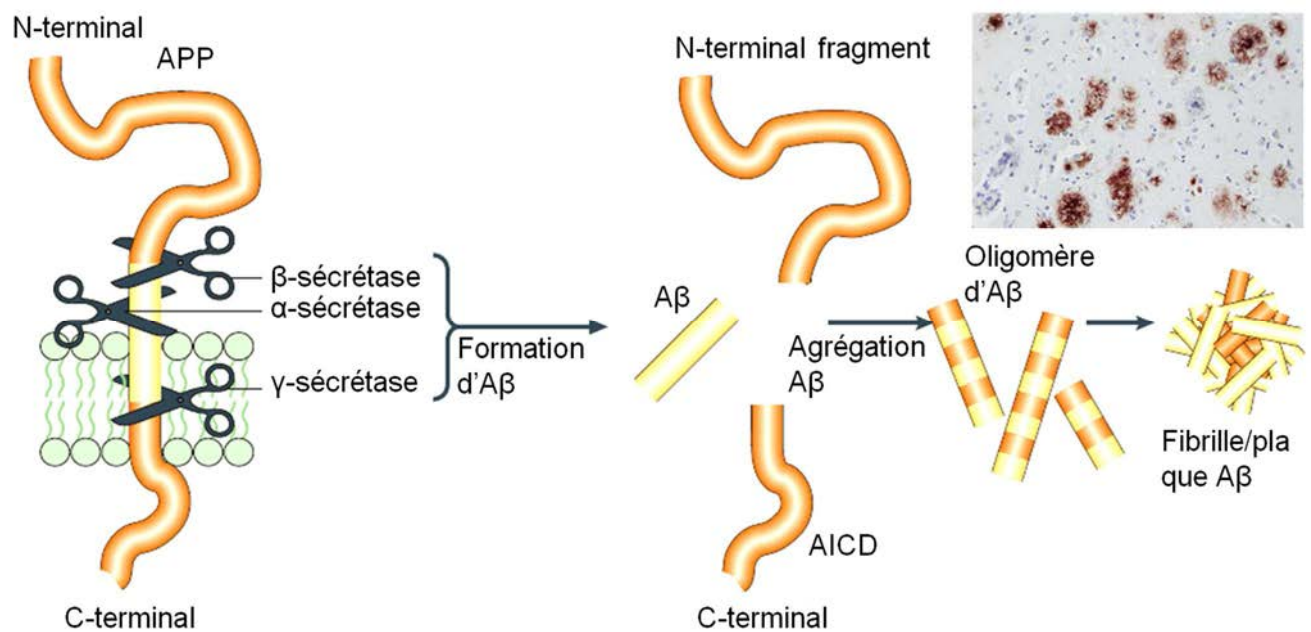


Figure 3. La voie amyloïdogénique : clivage de la protéine APP et production du peptide amyloïde- β .

Les enzymes β - et γ -sécrétases sont à l'origine de la production d'amyloïde- β par la voie amyloïdogénique alors que l'enzyme α -sécrétase est impliquée dans la voie non-amyloïdogénique de clivage de l'APP. Une fois le peptide amyloïde- β formé, il peut s'agréger et former des plaques amyloïdes. Figure adaptée de (Gotz and Ittner, 2008, Wirths et al., 2010).

2) Les associations pangénomiques et les mutations génétiques associées à la MA

La génétique a toujours joué un rôle important voire majeur dans la recherche sur la MA. Découverte des mutations des gènes de la protéine précurseur amyloïde (APP) et des présénilines-1 (PSEN1) et -2 (PSEN2), associées à la forme familiale de la MA, puis association de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (APOE- $\epsilon 4$) avec le risque de développer la forme sporadique de la MA et, plus récemment, les études pangénomiques (Genome-Wide Association Studies (GWAS)) permettant l'analyse à grande échelle des variations génétiques des individus souffrant de la MA.

Depuis 2003, l'initiative ADNI (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) a été lancée pour réunir un grand nombre de données d'imagerie IRM et PET, génétiques, de résultats de tests cognitifs et d'échantillons de sang et de liquide céphalo-rachidien (LCR) provenant de patients atteints de la MA et de contrôles sains. L'analyse et le traitement de toutes ces données a permis l'identification de nouveaux biomarqueurs de la MA ainsi que le suivi de la progression de ces marqueurs relativement à l'avancement de la MA (<http://adni.loni.usc.edu/>). Cette formidable banque de données a été analysée par des chercheurs afin d'identifier des associations génétiques entre les patients développant la forme sporadique de la MA.

a) Le clivage de l'APP : PSEN1, PSEN2 et ADAM10

Des mutations dans la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Goate et al., 1991) ou bien dans les enzymes des présénilines-1 (PSEN1) (Mullan et al., 1992) et -2 (PSEN2) (Sherrington et al., 1995), ou encore des composants du complexe de la γ -sécrétases menant au clivage amyloïdogénique de l'APP (**Figure 3**), sont associées au développement de la forme familiale de la MA.

Plus récemment, les GWAS ont permis l'identification d'un variant du gène ADAM10 (la principale enzyme α -sécrétase) impliqué dans le développement de la forme sporadique de la MA. Cette enzyme promeut le clivage non-amyloïdogénique de l'APP.

b) APOE et métabolisme du cholestérol

L'allèle $\epsilon 4$ du gène APOE est le facteur de risque le plus fort associé au développement de la MA (Corder et al., 1993). Son rôle dans le transport du cholestérol, la neuroplasticité et l'inflammation en fait une protéine fortement impliquée dans la pathogénèse de la MA (Kim et al., 2009). Des variants des gènes CLU et ABCA7, codant respectivement pour une apolipoprotéine et un transporteur du cholestérol, ont été aussi associés à la MA (Lambert et al., 2013, Karch and Goate, 2015).

c) Réponse immunitaire

Certains variants des gènes CR1 (protéine du complément), CD33 (récepteur présent sur les cellules microgliales et médiant leur activation), MS4A (famille de récepteurs des cellules myéloïdes et des monocytes) et TREM2 (récepteur présent sur les cellules microgliales qui stimule la phagocytose et inhibe l'inflammation) sont associés avec le développement de la MA et plus particulièrement la réponse immunitaire dans la MA (Lambert et al., 2013, Karch and Goate, 2015).

d) Endocytose

Différents gènes impliqués dans l'endocytose ont été identifiés dans les GWAS comme associés à la MA. Ces gènes sont BIN1 (impliqué dans la régulation de l'endocytose), PICALM (protéine nécessaire à l'assemblage des protéines formant la membrane de certaines vésicules: les clathrines), CD2AP (cette protéine a un rôle dans le trafic intracellulaire et l'organisation du cytosquelette) et SORL1 (protéine impliquée dans le trafic des vésicules de la membrane plasmique au réticulum endoplasmique) (Lambert et al., 2013, Karch and Goate, 2015).

L'identification de ces nouveaux gènes de susceptibilité de développer la MA questionne la pertinence des modèles existants de la MA, développés seulement à partir de l'identification des gènes mutés dans les formes familiales de la MA. Il semble nécessaire que de nouveaux modèles animaux soient créés afin d'étudier l'implication de ces gènes dans la pathogénèse de la MA.

3) La MA, une synaptopathie

Le terme de synapse a été introduit par C. Sherrington afin de désigner la jonction entre deux cellules nerveuses et permettant la transmission des messages nerveux. Les synapses sont des structures anatomiques spécialisées composées du compartiment présynaptique, du compartiment postsynaptique (épine dendritique) et de la fente synaptique. Les épines dendritiques possèdent des formes et des tailles variables (comprises entre 0,01 et 0,8 μm^3). Elles peuvent être composées de NMDAR, AMPAR, récepteurs métabotropiques et de protéines telles que PSD-95, synaptophysine ou p65. Dans les années 80, de nombreuses études post-mortem ont identifié une diminution du nombre de synapses chez les patients atteints de la MA (**Figure 4**) (Perdahl et al., 1984, Masliah et al., 1989). La perte synaptique est aussi un meilleur indice de corrélation des symptômes cognitifs que la présence des plaques amyloïdes (Serrano-Pozo et al., 2011), ce qui en fait un paramètre particulièrement intéressant pour l'étude de la MA. Les mécanismes conduisant à cette perte ne sont pas encore totalement élucidés mais l'implication de l'A β est fortement soupçonnée.

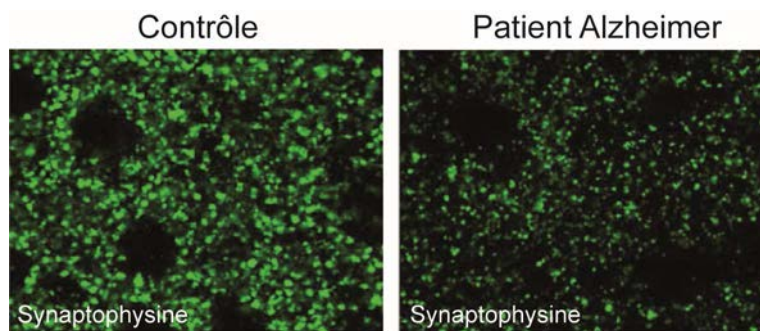


Figure 4. Perte synaptique chez les patients atteints de la MA.

Marquage de la protéine synaptophysine sur du tissu de patient atteint de la MA et du tissu de sujet sain. Modifiée de (Ho et al., 2005).

L'application d'A β sous forme d'oligomères promeut la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les neurones, possiblement via l'interaction de l'A β avec les NMDAR. En effet, l'ajout d'anticorps prévenant l'interaction entre l'A β et les NMDAR inhibe la production neuronale de ROS (De Felice et al., 2007). Des protéines des épines synaptiques comme la PSD-95, indispensable à la stabilisation des NMDAR, semblent avoir une expression diminuée en présence d'A β (Roselli et al., 2005). L'A β induit une perte synaptique et une diminution des influx calciques des neurones (Shankar et al., 2007). Ces effets nécessitent la présence d'amyloïde et sont dépendants de la forme agrégée de l'A β . La modulation de l'état d'agrégation de l'amyloïde peut prévenir les effets négatifs de l'A β (Shankar et al., 2007). Ainsi les monomères d'A β semblent moins toxiques pour les cellules nerveuses que les oligomères d'A β (Selkoe, 2008).

La potentialisation à long terme (LTP), un modèle d'étude de la plasticité synaptique, et la mémoire sont altérées en présence d'oligomères d'A β (Shankar et al., 2008). Cependant de nombreuses études sur l'influence de l'A β dans le maintien de la LTP montrent des résultats contradictoires (Marchetti and Marie, 2011). Bien que l'hétérogénéité des protocoles d'étude utilisés puisse être à l'origine de ces

différences, de nouvelles recherches restent nécessaires à la compréhension des mécanismes impliquant l'A β dans les perturbations synaptiques.

4) La MA, une maladie "métabolique"

Depuis de nombreuses années, le métabolisme cérébral peut être étudié de manière non invasive par FDG-PET (2-[^{18}F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glucose par Tomographie à Emission de Positrons). Les patients atteints de la MA présentent des diminutions du métabolisme dans différentes régions cérébrales (cortex frontal, cortex pariéto-temporal, hippocampe) (**Figure 5**). L'hypométabolisme cérébral des patients apparaît de façon précoce. En plus d'être un paramètre d'étude de la MA, le métabolisme cérébral est aussi devenu un outil diagnostique des démences cérébrales et de leur évolution (pour revue (Mosconi, 2005)).

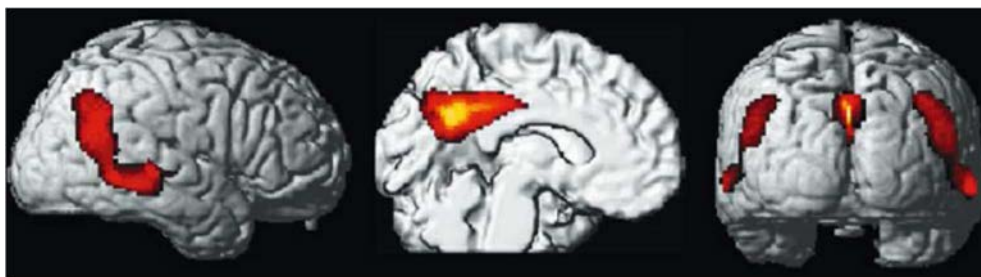


Figure 5. Les régions cérébrales montrant un hypométabolisme chez les patients atteints de la MA identifiées par FDG-PET.

Figure modifiée de (Mosconi, 2005).

Des études histologiques et biochimiques ont mis en évidence une diminution des transporteurs du glucose (principale source d'énergie du cerveau) chez les patients atteints de la MA (Simpson et al., 1994, Harr et al., 1995) ainsi qu'une réduction de l'activité d'enzymes du métabolisme (Sorbi et al., 1983, Gibson et al., 1988).

La MA est une maladie complexe touchant différentes structures cérébrales. Les deux principales caractéristiques auxquelles nous nous sommes intéressés sont les altérations de transmission synaptique et de métabolisme énergétique dans cette maladie. A l'origine, seule l'implication des neurones était étudiée car ce sont les cellules qui dégénèrent dans la MA. Cependant, l'émergence du rôle des cellules gliales dans la plupart des fonctions cérébrales (métabolisme et transmission synaptique notamment) en font aujourd'hui des acteurs majeurs de la régulation cérébrale. L'étude de leur rôle dans ces différentes fonctions et de leur implication potentielle dans la MA est primordiale.

B. Les interactions entre neurones et astrocytes en conditions physiologiques et pathologiques

Les neurones sont les cellules cérébrales qui ont été les plus étudiées en raison de leur rôle dans la communication nerveuse : la génération de potentiels d'action et de courants électriques. Cependant, dès 1846, Virchow a décrit un tissu connectif formant une sorte de ciment englobant les cellules nerveuses dans le cerveau et la moelle épinière (Garcia-Marin et al., 2007). Parmi ces cellules, celles ayant une forme étoilée ont été nommées "astrocytes" par Michael von Lenhossék en 1893. En 1909, Ramón y Cajal développe une méthode d'imprégnation des tissus permettant une meilleure visualisation des astrocytes. Leur forme particulière et leur localisation entre les neurones et les vaisseaux sanguins a permis de poser de nombreuses hypothèses quant à leur fonction dans le système nerveux : communication, support métabolique, maintien de l'homéostasie cérébrale, régulation du flux sanguin cérébral et de la transmission synaptique. L'étude intensive de cette population cellulaire a permis de valider la participation des astrocytes dans la plupart de ces fonctions cérébrales.

1) Organisation, morphologie et fonction des astrocytes

a) En condition physiologique

Les astrocytes sont une population hétérogène au niveau de leur localisation, de leur morphologie et de leur statut d'activation. Les astrocytes protoplasmiques, situés dans la substance grise, sont en contact avec les synapses et les astrocytes fibreux, situés dans la substance blanche, sont au contact des axones et des vaisseaux sanguins (Miller and Raff, 1984) (**Figure 6C,E**). Les astrocytes interagissent avec les vaisseaux sanguins via leurs pieds astrocytaires. Leur morphologie a tout d'abord été identifiée par des marquages de différentes protéines spécifiquement exprimées dans les astrocytes comme la GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), un filament intermédiaire, ou la S100 β , une protéine de liaison au calcium. Plus récemment, la complexité de la morphologie des astrocytes a été étudiée par des expériences de remplissage des astrocytes avec différents colorants fluorescents. En effet, le marquage GFAP ne représente qu'environ 15% du volume total occupé par l'astrocyte, l'utilisation de colorants fluorescents a permis de décrire plus précisément la morphologie astrocytaire (Bushong et al., 2002) (**Figure 6A**). Ces expériences témoignent aussi de l'organisation en domaines distincts des astrocytes, sans recouvrement de leur domaine respectif (**Figure 6B**). Les astrocytes sont organisés en réseau communicant via de nombreuses gap-junctions formées principalement par les connexines 43 et 30 (Giaume et al., 2010) (**Figure 6D**). Ces canaux permettent le transport et l'échange de plusieurs molécules tels les ions, des métabolites énergétiques ou encore des seconds messagers.

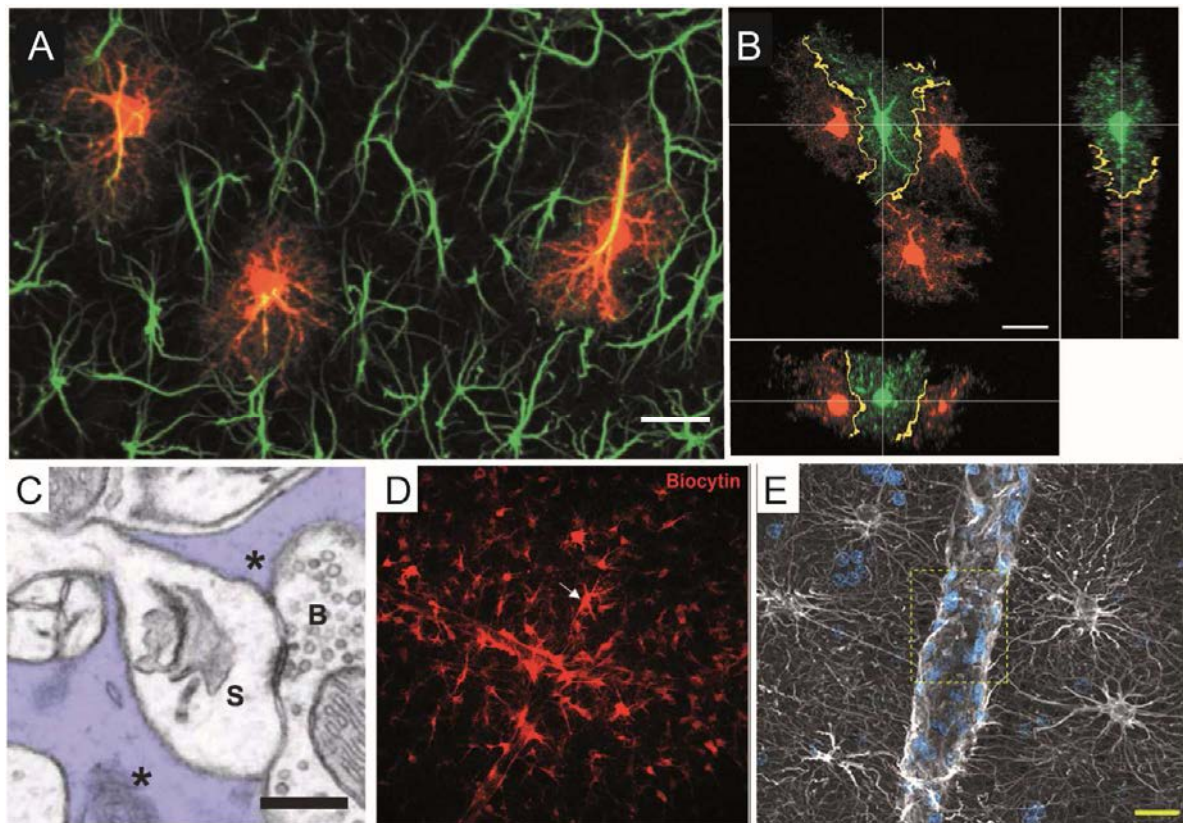


Figure 6. Morphologie et caractéristiques des astrocytes.

A. Le marquage immunologique de la GFAP et le remplissage de certains astrocytes avec un colorant rouge montre la perte de complexité morphologique d'un simple marquage GFAP des astrocytes.

B. Des astrocytes voisins remplis de colorants de différentes couleurs témoignent de l'organisation des astrocytes en domaines distincts.

C. Image de microscopie électronique montrant une épine dendritique (S) et un bouton synaptique (B), les astrocytes sont en bleu et marqués d'une étoile (*).

D. Un astrocyte (indiqué par une flèche) a été rempli par un colorant fluorescent (Biocytine) qui a diffusé par les gap-junctions présentes dans le réseau astrocytaire.

E. Un vaisseau sanguin recouvert de pieds astrocytaires visualisés par un marquage de la GFAP (blanc). Figure adaptée de (Bushong et al., 2002, Genoud et al., 2006, Oberheim et al., 2009, Escartin and Rouach, 2013).

Les astrocytes, bien que partageant des caractéristiques communes, sont une population cellulaire hétérogène. Selon la morphologie des astrocytes, leur expression des protéines GFAP ou S100 β , leur densité ou encore leur fréquence de prolifération, différents types d'astrocyte peuvent être identifiés : la glie de Bergmann, la glie épendymale, les astrocytes fibreux de la substance blanche, les astrocytes protoplasmiques de la substance grise, la glie radiaire ou encore la glie périvasculaire (Emsley and Macklis, 2006). Ainsi l'hippocampe des souris possède une forte densité d'astrocytes GFAP+ (500 cellules par mm²) proliférant peu et une population moins dense d'astrocytes S100 β + (100 cellules par mm²) ayant une fréquence de prolifération d'environ 10% (Emsley and Macklis, 2006).

En plus de leurs différences morphologiques, des populations astrocytaires ayant un profil moléculaire différent sont observées (Doyle et al., 2008). Par exemple, l'expression des transporteurs au glutamate (GLT1 et GLAST) évolue au cours du développement (Regan et al., 2007) et le transporteur GLAST est principalement exprimé dans la glie de Bergmann du cervelet. Les astrocytes peuvent avoir une

sensibilité différente aux neurotransmetteurs selon leur localisation (Oberheim et al., 2012) et leur couplage peut être différent. Ainsi, les astrocytes de la substance grise forment un syncytium alors que ceux de la substance blanche ne semblent pas couplés (Haas et al., 2006). Dans l'hippocampe, des réseaux astrocytaires circulaires ou allongés ont été identifiés selon la localisation des astrocytes dans le stratum radiatum ou la couche de cellules pyramidales (Houades et al., 2006). Deux populations astrocytaires ont été observées dans le cortex de souris basées sur les variations du volume des astrocytes en situation ischémique (Benesova et al., 2009). L'hétérogénéité astrocytaire au sein d'une structure cérébrale existe : morphologie, couplage, profil moléculaire.

Des études se penchent sur l'origine développementale des astrocytes et le lien entre cette origine et l'hétérogénéité de populations observée. En effet, au cours du développement cérébral, les astrocytes sont alloués à un domaine spatial défini pouvant suggérer un rôle spécifique de ces cellules dans le système nerveux adulte (Tsai et al., 2012).

Tous ces résultats démontrent qu'il existe une grande diversité au sein de la population astrocytaire et suggèrent des rôles différents selon la région cérébrale, le type de neurones qu'ils contactent, l'expression de récepteurs aux divers neurotransmetteurs ou leur profil moléculaire. Au cours des dernières années, le développement d'outils génétiques de plus en plus performants a aidé à la compréhension des fonctions de ces populations distinctes. Le StarTrack permet ainsi de suivre une lignée astrocytaire issue d'un seul progéniteur (Bribian et al., 2015), le tri des différentes populations cérébrales par FACS permet des analyses transcriptomiques (Zhang et al., 2014) ou encore l'imagerie à l'échelle cellulaire permettant le suivi de différentes molécules (Ca^{2+} , métabolites...)(Barros et al., 2013, Tong et al., 2013).

b) En condition pathologique

En condition pathologique, les astrocytes changent de morphologie, le soma des cellules s'hypertrophie et les prolongements cellulaires s'épaississent : les astrocytes deviennent réactifs. Ce changement morphologique s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la GFAP et de la vimentine. La réactivité astrocytaire est un marqueur des lésions du système nerveux central. Dans la MA, ce phénomène de réactivité a été observé chez les patients, notamment à proximité des plaques A β (Beach et al., 1989, Itagaki et al., 1989) (**Figure 7**). La réactivité astrocytaire pourrait servir à isoler les plaques A β du reste du cerveau afin de le protéger ou elle pourrait aussi permettre l'accélération de la phagocytose de l'amyloïde. Bien que des études contradictoires existent (DeWitt et al., 1998), la plupart des études montrent que les astrocytes réactifs peuvent dégrader les dépôts d'A β (Wyss-Coray et al., 2003). Cette dégradation, bien que moins efficace que celle des cellules microgliales, se fait via le système d'autophagie (Pomilio et al., 2015).

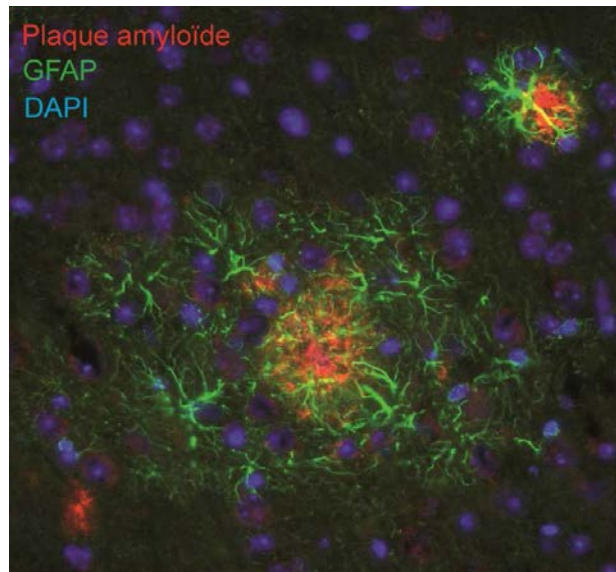


Figure 7. Réactivité des astrocytes entourant les plaques amyloïdes.
Figure modifiée d'E. Hol Lab.

La réactivité astrocytaire pourrait aussi être délétère dans la MA selon une publication récente de l'équipe d'E. Hol. L'isolation d'astrocytes de souris transgéniques de la MA a permis une analyse de leur profil transcriptomique. Les résultats suggèrent une altération de l'expression des gènes nécessaires au support et à la communication neuronale (Orre et al., 2014a). Il serait intéressant de reproduire cette étude dans des régions autres que le cortex afin d'étudier l'hétérogénéité des réponses astrocytaires.

2) Les interactions neurones-astrocytes

La morphologie particulière des astrocytes leur permet d'être en contact avec les synapses et le système sanguin, et de créer un réseau de communication permettant de détecter les modifications de l'environnement et d'aider au maintien de l'homéostasie cérébrale. Leur interaction avec les neurones est indispensable au bon fonctionnement cérébral (**Figure 8**).

a) Régulation des flux ioniques

Les astrocytes régulent le pH extracellulaire du cerveau. Ils métabolisent le CO_2 via l'action de l'enzyme CA (anhydrase carbonique), très abondante dans les astrocytes, pour former du bicarbonate (HCO_3^-) et un proton (H^+). Le bicarbonate et le sodium (Na^+) sont transportés dans le milieu extracellulaire via le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ où le bicarbonate pourra éviter l'acidification du milieu extracellulaire en se liant à un proton, permettant ainsi le maintien du pH extracellulaire (**Figure 8**).

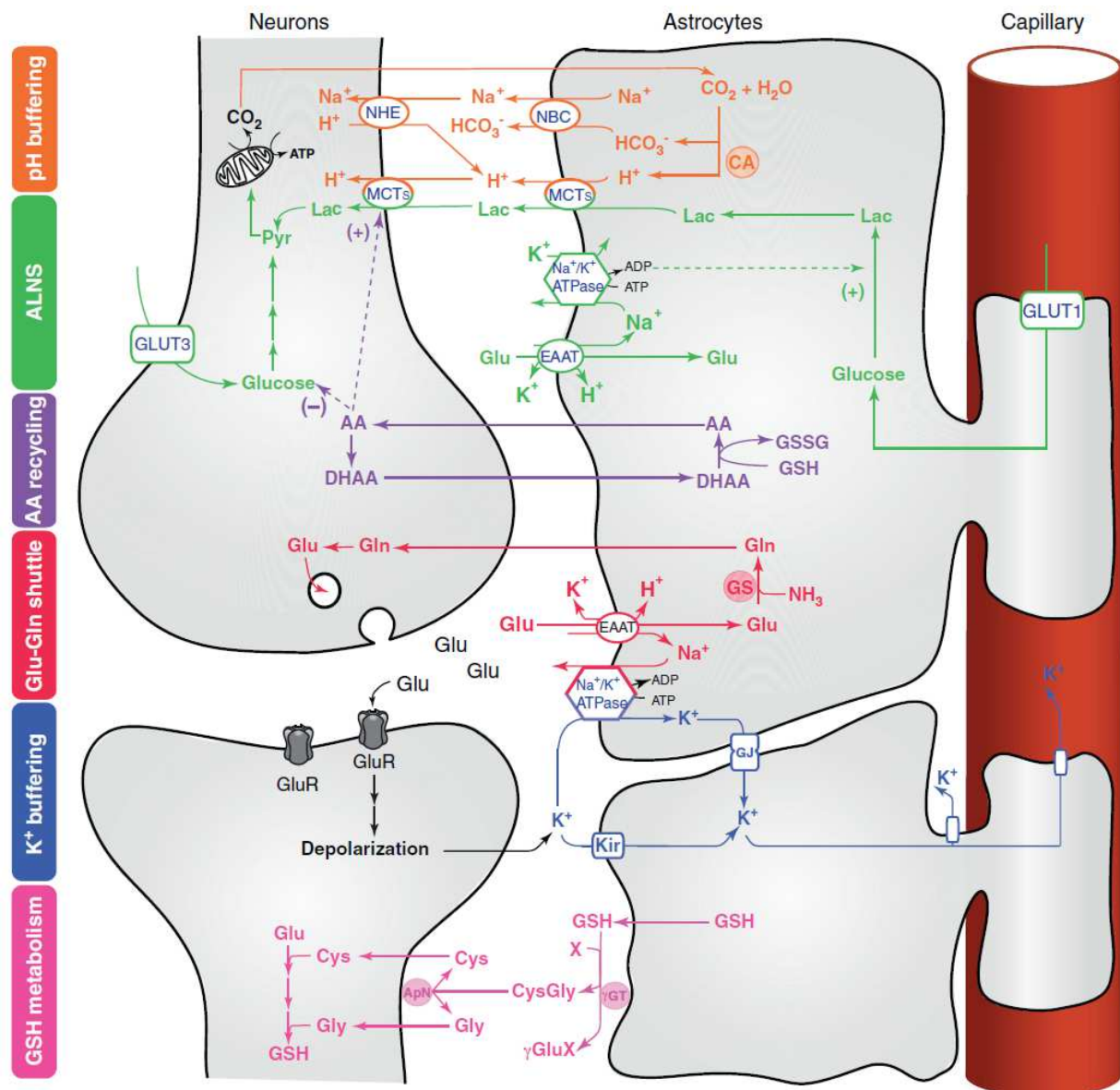


Figure 8. Les astrocytes sont indispensables à la régulation de l'homéostasie cérébrale.

Les astrocytes sont impliqués dans de nombreuses interactions avec les neurones. Ils sont nécessaires au maintien du pH, constituent un support métabolique pour les neurones et sont indispensables au bon fonctionnement des synapses (absorption du glutamate afin d'éviter l'excitotoxicité et recyclage de ce neurotransmetteur). Enfin ils procurent des défenses anti-oxydantes aux neurones. Figure tirée de (Allaman et al., 2011).

Grâce au "canal à eau" (water channel) aquaporine 4 (AQP4), les astrocytes peuvent maintenir l'équilibre hydrique du cerveau. L'activité neuronale entraîne la libération d'une grande quantité de potassium (K^+) dans le milieu extracellulaire. Les neurones et les astrocytes possèdent des transporteurs au K^+ mais ce sont les astrocytes qui en possèdent le plus grand nombre et surtout des plus spécialisés : Kir4.1, Na^+/K^+ -ATPase et $Na^+/K^+/2Cl^-$ notamment. L'inhibition du transporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$ ne perturbe pas l'élimination du K^+ libéré lors de l'activité neuronale contrairement aux Kir4.1 et Na^+/K^+ -ATPase (Larsen et al., 2014). Le Kir4.1 semble spécialisé dans l'absorption du K^+ dans des régions localisées au moment de la transmission synaptique alors que le Na^+/K^+ -ATPase interviendrait

dans la phase post-stimulus (Larsen et al., 2014). Ces transporteurs permettent aussi de maintenir l'équilibre ionique du sodium (Na^+) et du chlorure (Cl^-). Les astrocytes sont donc des acteurs de la régulation des flux ioniques dans le cerveau.

b) Défenses anti-oxydantes

La phosphorylation oxydative produit de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le cerveau ayant un fort métabolisme oxydatif, il est donc nécessaire de réguler cette production de ROS. Les astrocytes possèdent de nombreuses défenses contre les ROS notamment le glutathione peroxydase et la catalase. Ils libèrent des molécules anti-oxydantes dans l'espace extracellulaire comme le glutathion (GSH) ou l'acide ascorbique qui peuvent être utilisées par les neurones pour neutraliser les ROS (**Figure 8**). La synthèse de glutathion est limitée par la disponibilité de cystine. L'échangeur cystine/glutamate (xCT) est nécessaire à cet apport de cystine. Shih et al. ont montré que l'augmentation de l'expression de ce transporteur dans les astrocytes est suffisant pour augmenter la synthèse et la libération de glutathion afin d'assurer la protection des neurones contre un stress oxydatif (Shih et al., 2006).

Dans la MA, les défenses anti-oxydantes semblent altérées. La présence d'A β peut induire la production de ROS par les astrocytes conduisant à la diminution drastique de GSH (Abramov et al., 2003). L'A β provoque une augmentation calcique dans les astrocytes pouvant induire une augmentation de ROS par l'activation de la NADPH oxydase. L'inhibition de cette enzyme ou du calcium extracellulaire diminue la production de ROS (pour revue (Angelova and Abramov, 2014)).

c) Régulation du flux sanguin et de la BBB

La barrière hémato-encéphalique (BBB) est une composante indispensable à la régulation de l'interface entre tissu cérébral et réseau sanguin. Elle permet notamment la régulation ionique, hydrique et la concentration des métabolites. La BBB est composée des cellules endothéliales, de la membrane basale des vaisseaux, des péricytes et des pieds astrocytaires périvasculaires (**Figure 9**). Les cellules endothéliales possèdent de nombreuses jonctions serrées afin de contrôler finement l'entrée de molécules dans le tissu cérébral (Dejana et al., 2008). Les transporteurs spécifiques des cellules endothéliales et des pieds astrocytaires participent à la régulation des flux entre le tissu cérébral et le réseau vasculaire. L'expression des transporteurs Kir4.1, GLUT-1 et AQP4 au niveau des pieds astrocytaires peut réguler la concentration potassique du tissu cérébral, l'apport de métabolites et la redistribution de l'eau (Abbott et al., 2006). Les astrocytes participent aussi à la croissance et au maintien de la BBB en sécrétant des facteurs comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), les angiopoïétines ou le GDNF (Glia-Derived Neurotropic Factor) (Alvarez et al., 2013).

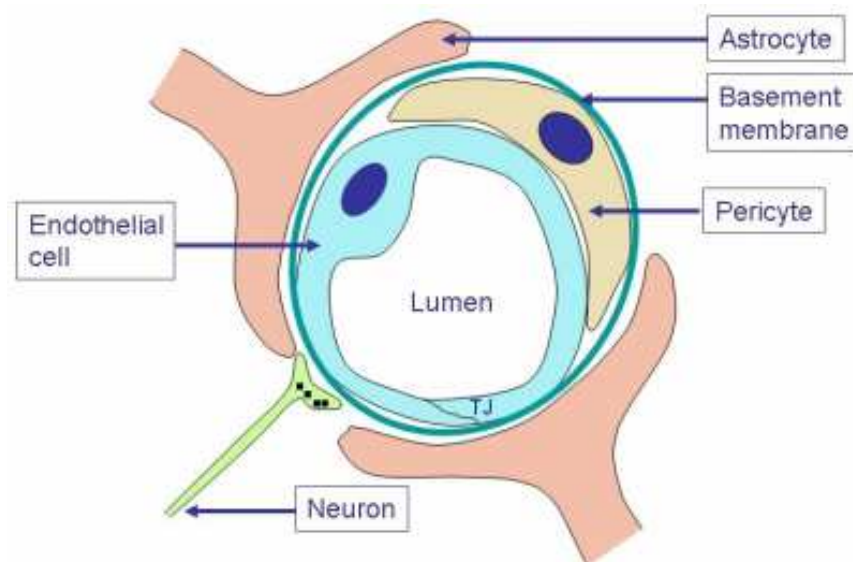


Figure 9. Les astrocytes sont impliqués dans la régulation et le maintien de l'intégrité de la BBB.

Les pieds astrocytaires sont en contact étroit avec les composants de la BBB, péricytes, membrane basale et cellules endothéliales. Les astrocytes participent au contrôle des flux ioniques, hydriques et des métabolites entre le système vasculaire et le tissu cérébral. Figure issue d'I. Krizbai Lab.

L'activité neuronale induit une augmentation du flux sanguin cérébral. Les astrocytes et les neurones via les cellules musculaires lisses et les péricytes participent à ces changements de flux sanguins. De par leur localisation proche des vaisseaux et des neurones ainsi que leur morphologie permettant la communication entre des cellules, les astrocytes ont rapidement été "soupçonnés" d'être des acteurs potentiels permettant la modulation du flux sanguin cérébral. En effet, de nombreuses études ont montré que l'activité neuronale pouvait être détectée par les astrocytes qui vont y répondre par la libération de molécules vasoactives au niveau des pieds astrocytaires. Ces molécules vasoactives sont issues du métabolisme de l'acide arachidonique : la PGE2 (Prostaglandine E2) et l'EET (Acide Epoxyeicosatrienoïque) dilatent les vaisseaux alors que le 20-HETE (Acide 20-hydroxy-eicosatetraenoïque) induit leur contraction (**Figure 10**) (MacVicar and Newman, 2015). Avec l'amélioration des techniques d'observations des cellules *in vitro* et *in vivo*, des études plus récentes ont montré que tous les astrocytes ne réagissent pas de la même façon lors d'une activation neuronale. Certaines équipes ont identifié une population d'environ 5-8% des astrocytes ayant une réponse calcique, mais la rapidité de cette réponse (de l'ordre de 0,6 sec ou de plusieurs secondes) reste controversée. De même pour la localisation de cette réponse qui est placée dans les prolongements astrocytaires ou dans le soma des cellules selon les études (pour revue (Filosa et al., 2015)). Ces résultats soulèvent l'hypothèse de différentes populations astrocytaires réagissant de manière différée et différente à l'activité neuronale et à l'augmentation du flux sanguin.

Afin d'étudier le rôle des astrocytes et de leur réponse calcique qui semble impliquée dans la régulation du flux sanguin, des souris IP₃R2-KO ont été utilisées. La principale voie de libération du calcium des astrocytes est inhibée chez ces souris. Malgré cette inhibition, plusieurs articles ont montré que ces souris avaient une réponse vasculaire normale (Filosa et al., 2015). Différentes explications sont envisageables notamment l'implication d'une autre source de calcium (via la famille des TRP (Transient

Receptor Potential cation channel) par exemple), la mise en place de mécanismes de compensation chez ces souris ou bien le fait que les astrocytes ne jouent pas un rôle primordial dans la régulation du flux sanguin cérébral.

D'autres équipes se sont penchées sur l'implication des neurones dans la modulation du flux sanguin cérébral. Les neurones produisent aussi une réponse à la transmission synaptique permettant la modulation du flux sanguin sous forme de PGE2 et de monoxyde d'azote (NO) (**Figure 10**). Les neurones semblent être la principale source de PGE2 du cerveau pendant une stimulation sensorielle et non les astrocytes comme précédemment décrit (Lacroix et al., 2015).

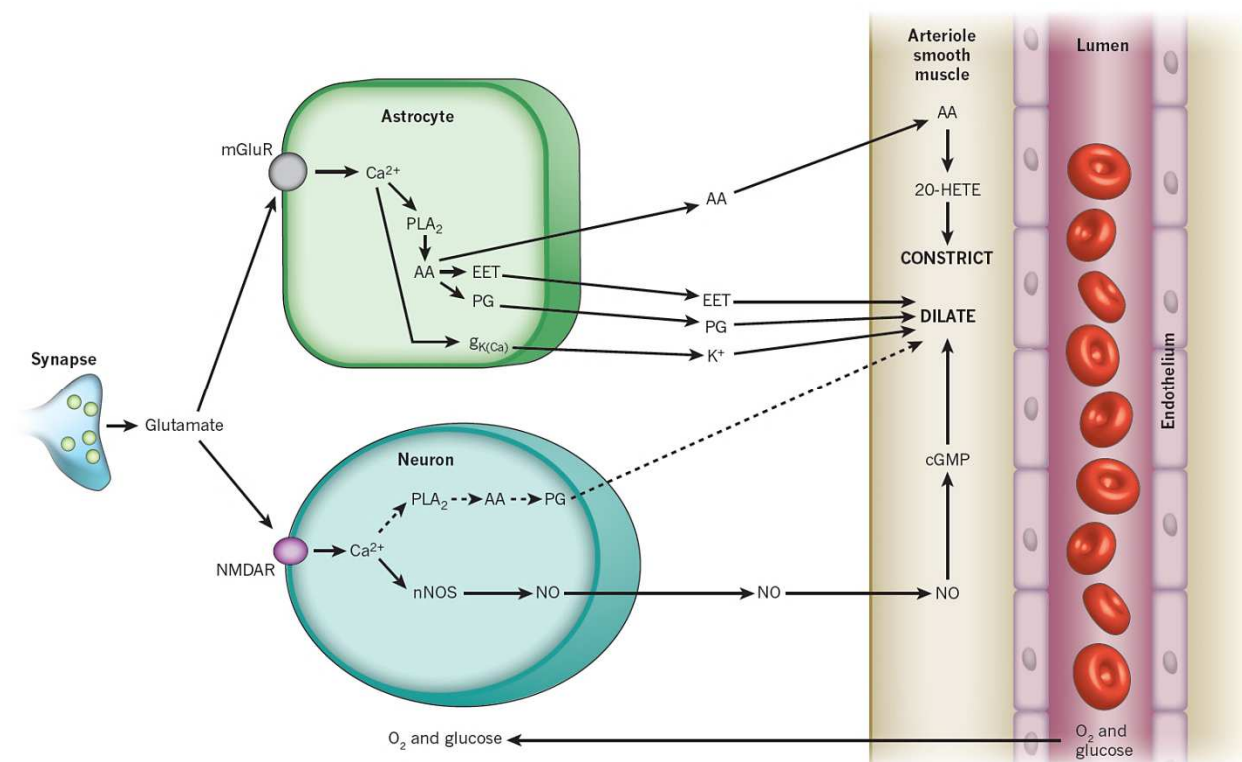


Figure 10. Les astrocytes participent au couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin.

L'activité neuronale induit la production de NO dans le compartiment post-synaptique, ayant un effet vasodilatateur. Les astrocytes répondent à l'activité neuronale par la production de molécules vasodilatatrices (EET, PGE2) mais aussi de molécules permettant la constriction des vaisseaux sanguins (20-HETE). Figure issue de (Attwell et al., 2010).

L'étude du flux sanguin cérébral est un domaine controversé. Les études *in vivo* et *in vitro* donnent parfois des résultats contradictoires quant à la régulation du flux sanguin car les conditions expérimentales sont très différentes : absence de tonus, pas de flux sanguin, concentration en oxygène différente pour les études *in vitro* par exemple. L'intégration de ces résultats et de ceux qui seront publiés dans les prochaines années permettra probablement de déterminer plus précisément le rôle des différents types cellulaires dans la régulation du flux sanguin cérébral. Différents types cellulaires sont sûrement impliqués, voire des sous-populations de ces types cellulaires qui peuvent intervenir en fonction du type d'activation neuronale ou de la région cérébrale activée : l'intégration de toutes ces signaux pouvant conduire à la modulation du flux sanguin.

d) Intégrité de la BBB et flux sanguin dans la MA

Certains patients atteints de la MA souffrent d'angiopathie amyloïde cérébrale, de micro-infarctus et de perturbation de la BBB (Iadecola, 2004, Zlokovic, 2011). La perte des jonctions serrées entre les péricytes et les cellules endothéliales peut causer le passage de protéines présentes dans le sang (notamment de l'hémoglobine, la plasmine ou la thrombine) dans le cerveau. Les cellules gliales sont sensibles à ces protéines qui peuvent provoquer la formation de ROS dans les astrocytes, entraînant une diminution du pool de GSH astrocytaire et donc de GSH libéré par les astrocytes. Cette diminution de GSH peut entraîner une altération des défenses anti-oxydantes des neurones et médier la toxicité neuronale. La production de ROS et l'activation astrocytaire peut activer l'expression de la β -sécrétase dans les astrocytes, une enzyme spécifique des neurones en condition physiologique (Rossner et al., 2005). Cette expression de la β -sécrétase dans les astrocytes semble délétère dans la MA car elle active le clivage amyloïdogénique de l'APP. La réduction du flux sanguin cérébral peut induire une hypoxie localisée entraînant l'augmentation du clivage amyloïdogénique de l'APP. Le facteur HIF1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1 α) médie l'augmentation de la transcription de la β -sécrétase, de la phosphorylation de la protéine tau via la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et la diminution de l'enzyme de dégradation de l'A β , la néprilysine (Zhang et al., 2007, Fang et al., 2010, Wang et al., 2011).

Une diminution de l'expression des transporteurs au glucose GLUT1 au niveau de la BBB, une rétraction des pieds astrocytaires et une altération de la morphologie des péricytes a été décrite chez les souris exprimant le peptide A β (Merlini et al., 2011). Tous ces événements conduisent à une perturbation de la BBB chez ces souris exprimant une forme mutée de l'APP, or le maintien de la BBB semble indispensable pour préserver l'intégrité cérébrale.

e) Support métabolique des neurones

Ne représentant que 2% du poids total du corps humain, le cerveau consomme 20% des ressources en oxygène et glucose. Selon les derniers travaux d'Engl et Attwell, un modèle de distribution de l'énergie utilisée par les différentes activités du cerveau a été proposé (**Figure 11**) (Engl and Attwell, 2015).

Selon ce modèle, 60% de l'énergie consommée par le cerveau est utilisée pour la transmission synaptique et la restauration des gradients ioniques. La consommation de glucose, la principale source d'énergie du cerveau, est couplée à l'activité synaptique (Magistretti, 2006). Cette hypothèse de couplage neuro-métabolique a été proposée dès les années 70 avec les travaux de L. Sokoloff qui, par modification d'une activité fonctionnelle locale, a montré la corrélation avec l'accumulation de ^{14}C -2-désoxyglucose (2DG). En bloquant la vision par exemple, une diminution de l'accumulation de 2DG dans les régions cérébrales correspondantes est observée (des Rosiers et al., 1978).

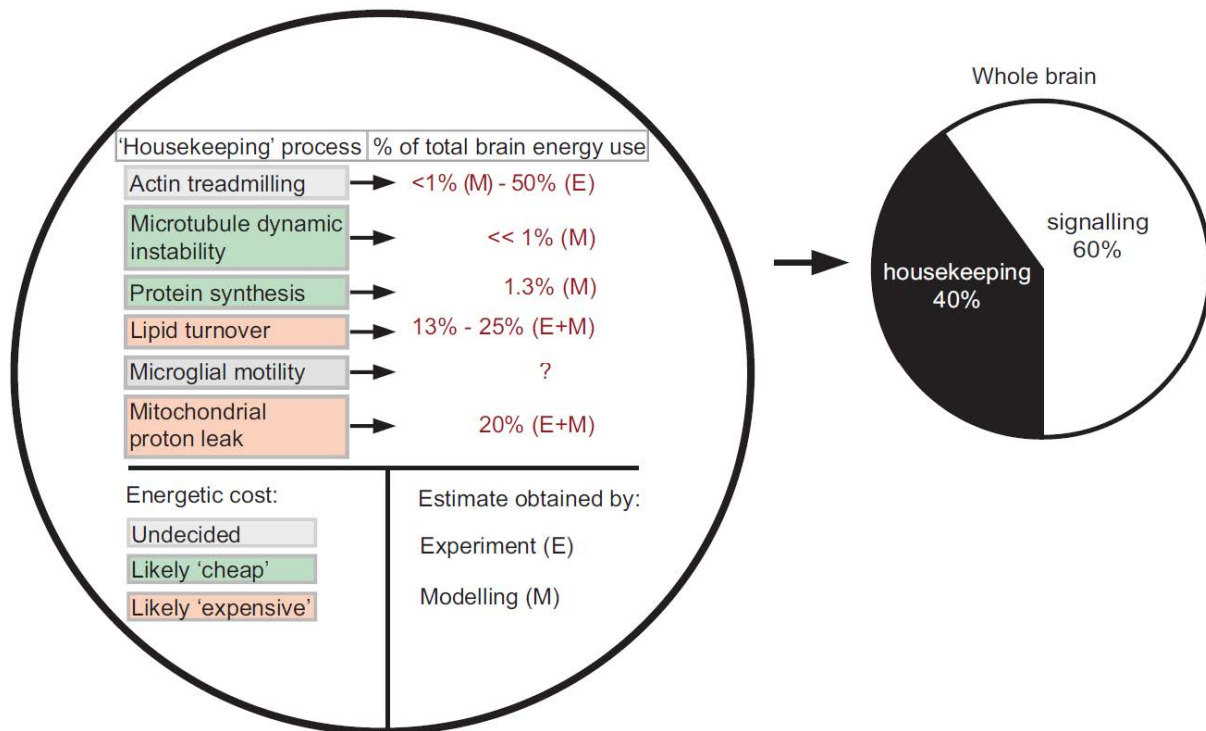


Figure 11. Dernier modèle résumant la distribution de la consommation d'énergie autre que la communication neuronale.

Modèle théorique fondé sur des estimations et des données expérimentales. Figure de (Engl and Attwell, 2015).

En 1994, un modèle impliquant les astrocytes dans ce couplage neuro-métabolique a été proposé (Pellerin and Magistretti, 1994). La transmission synaptique conduit à la libération de glutamate extracellulaire qui est en grande partie capté par les astrocytes via les transporteurs au Na^+ /glutamate GLT1 et GLAST. L'entrée du glutamate dans l'astrocyte est accompagnée de l'entrée de molécules de Na^+ qui sont rejetées dans le milieu extracellulaire via la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Ce transport nécessite l'utilisation d'ATP et produit des molécules d'ADP et Pi qui peuvent activer l'entrée de glucose dans les astrocytes via le transporteur GLUT1. Le glutamate peut stimuler la glycolyse astrocytaire et la synthèse de son produit final, le lactate. Ce lactate serait transporté dans les neurones via les MCT (MonoCarboxylate Transporteur) où il peut être converti en pyruvate, qui entrera dans le cycle de Krebs (TCA cycle) pour produire l'ATP nécessaire aux neurones. Ce transport du lactate entre les astrocytes et les neurones est appelé l'ANLS (Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle) (**Figure 12**).

D'autres modèles que l'ANLS existent, en particulier le NALS (Neuron-Astrocyte Lactate Shuttle) faisant l'hypothèse d'un échange de lactate des neurones aux astrocytes (Mangia et al., 2009) ou bien l'hypothèse selon laquelle les neurones aient un métabolisme plus glycolytique que les astrocytes et qu'ils ne dépendent donc pas du lactate astrocytaire pour subvenir à leur besoin énergétique (Lundgaard et al., 2015).

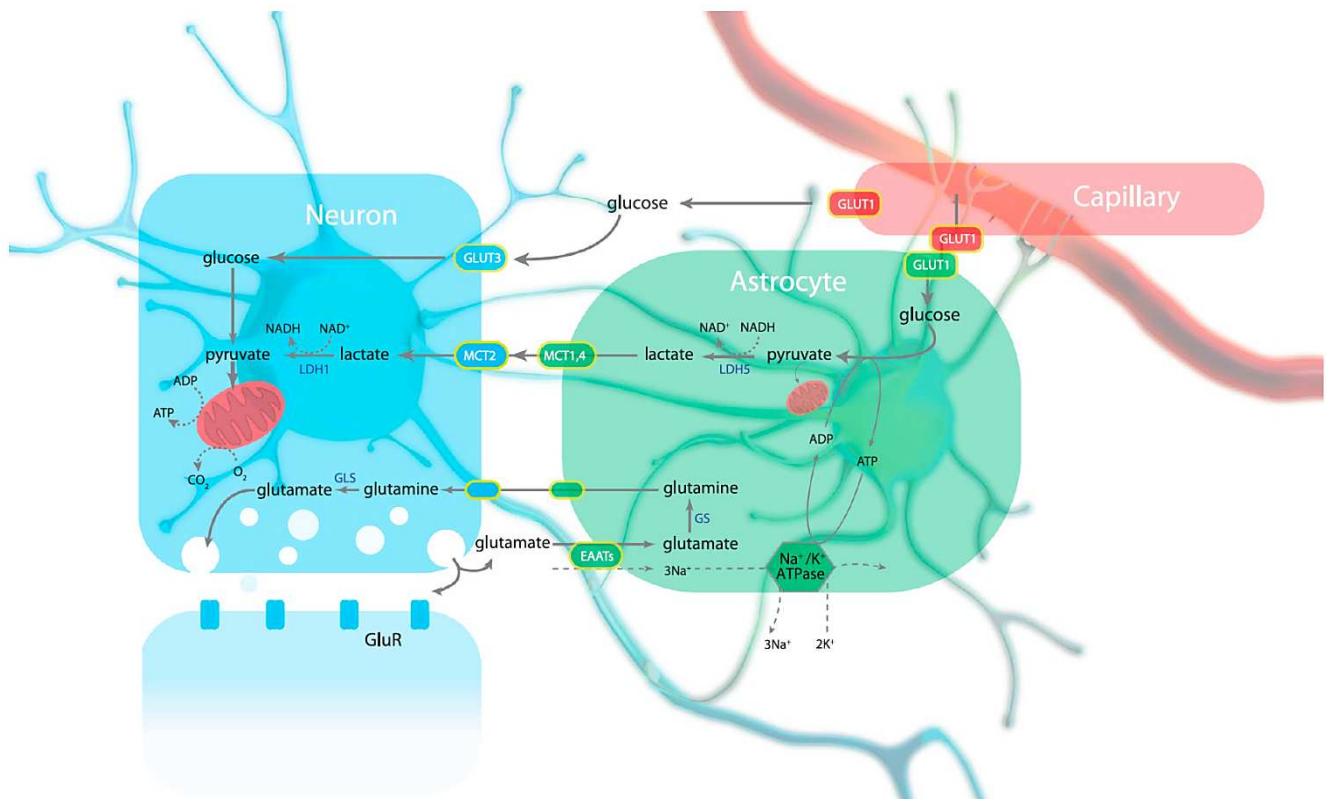


Figure 12. Le couplage neuro-métabolique nécessite les astrocytes.

Cette représentation schématique de l'ANLS (Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle) montre l'activation de la glycolyse dans les astrocytes lors de l'activité synaptique. Le métabolisme du glucose conduit à la formation de pyruvate qui est converti en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH5). Ce lactate est ensuite transporté via les transporteurs MCT (MonoCarboxylate Transporteur). Dans les neurones, le lactate peut être utilisé comme source d'énergie après conversion en pyruvate. Figure de (Magistretti and Allaman, 2015).

Cependant, de nombreuses études supportent l'hypothèse de l'ANLS notamment grâce au développement de sondes FRET sensibles à différents métabolites (glucose (Fehr et al., 2003), lactate (San Martin et al., 2013), pyruvate (San Martin et al., 2014), NADH/NAD⁺ (Hung et al., 2011)) et pouvant s'exprimer dans des types cellulaires spécifiques. Ces sondes FRET permettent actuellement l'étude dynamique des flux métaboliques dans les cellules.

L'inhibition de la recapture du glutamate par les astrocytes de souris n'exprimant pas GLT1 ou GLAST, entraîne une perte de la réponse métabolique *in vivo* (Voutsinos-Porche et al., 2003). L'augmentation de la glycolyse et de la libération de lactate par les astrocytes n'est plus observée. En plus du glutamate, l'activité neuronale conduit à la libération de différentes molécules pouvant influencer le métabolisme astrocytaire. C'est le cas du potassium (K⁺) et de l'ammonium (NH₄⁺) qui peuvent augmenter la glycolyse astrocytaire ou la production et la libération de lactate respectivement (Bittner et al., 2010, Lerchundi et al., 2015).

L'importance du rôle du métabolisme astrocytaire dans la transmission synaptique a été élégamment montrée par une étude menée par Rouach et al. En utilisant des tranches de cerveaux, les auteurs ont

montré une perte d'activité synaptique en absence de glucose extracellulaire. Mais l'administration de glucose ou de lactate dans un astrocyte (même un astrocyte éloigné du site de transmission synaptique) peut restaurer la transmission synaptique, soulignant l'importance du couplage astrocytaire et de leur métabolisme. Cette étude suggère aussi l'importance des échanges entre astrocytes et neurones car cette activité synaptique n'est pas restaurée par ajout de glucose/lactate astrocytaire lors de l'inhibition des transporteurs au lactate (MCT) : l'échange de lactate entre les astrocytes et les neurones semble nécessaire à la transmission synaptique (Rouach et al., 2008).

Les astrocytes sont les seules cellules du cerveau capable de synthétiser et stocker le glycogène produit à partir du glucose car ils expriment l'enzyme glycogène synthétase (Brown and Ransom, 2007). Les neurones aussi expriment cette enzyme mais la voie de production du glycogène dans ces cellules est inactivée par un mécanisme de dégradation continue de cette enzyme (Vilchez et al., 2007). Le glycogène astrocytaire peut être mobilisé en cas de besoin métabolique, il est alors hydrolysé en glucose-6-phosphate (G6P) qui peut entrer dans la voie de la glycolyse. L'équipe de B. McVicar a montré que l'élévation extracellulaire de K^+ lors de l'activité neuronale ou l'absence de glucose peut entraîner une modification du pH extracellulaire qui est perçue par les astrocytes. Cette modification de pH, via l'enzyme adénylyle cyclase soluble (sAC), pourrait activer la glycogénolyse et donc la production de lactate par les astrocytes (**Figure 13**) (Choi et al., 2012).

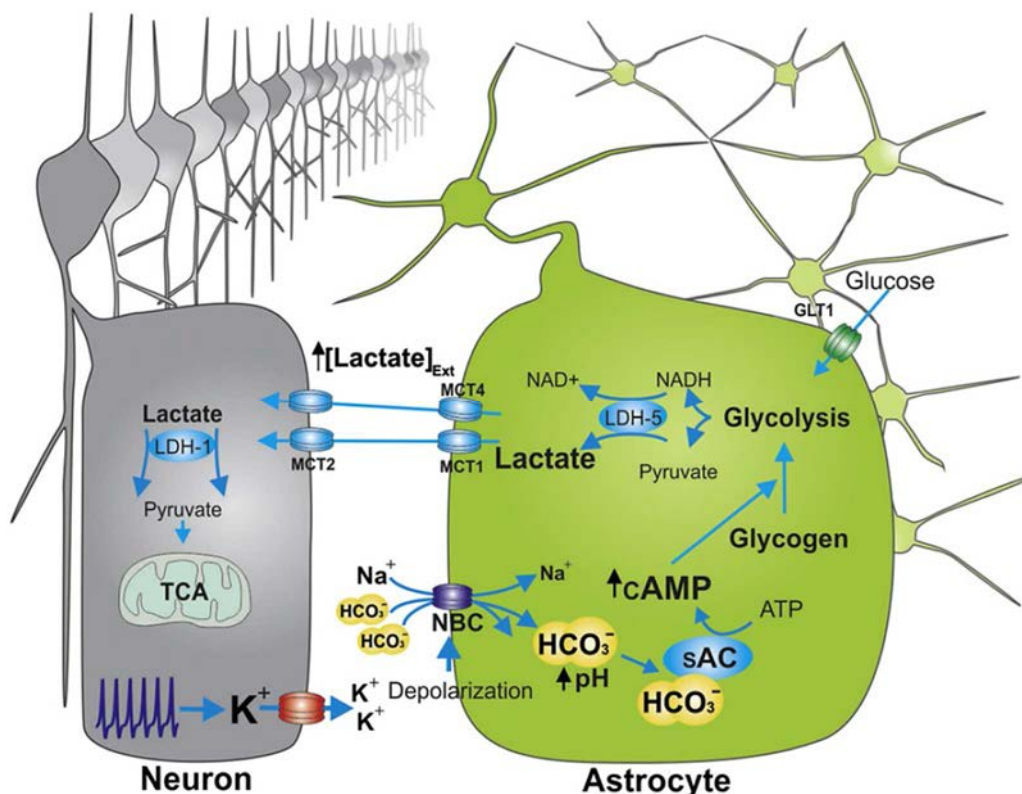


Figure 13. Implication du potassium et du glycogène dans l'ANLS.

L'augmentation extracellulaire de la concentration en K^+ lors de l'activité synaptique induit l'entrée du bicarbonate (HCO_3^-) dans les astrocytes, entraînant l'activation de l'adénylyle cyclase soluble (sAC). sAC active la synthèse d'AMPc qui facilite la dégradation du glycogène et par conséquent la production de lactate. Figure issue de (Choi et al., 2012).

L'étude par RNAseq des différentes populations cellulaires cérébrales par l'équipe de B. Barres a confirmé la spécificité de voies du métabolisme énergétique entre les astrocytes et les neurones (Zhang et al., 2014). Cette étude met en évidence la présence plus importante d'enzymes régulatrices de la glycolyse dans les astrocytes, leur permettant d'adapter leur flux glycolytique, ce que les neurones ne peuvent pas faire. De plus, l'enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase isoforme 3 (PFKFB3) qui permet la production du fructose-2,6-bisphosphate (F2,6P₂), un activateur de l'enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK1) (régulateur majeur de la glycolyse) est différenciellement régulée dans ces populations cellulaires.

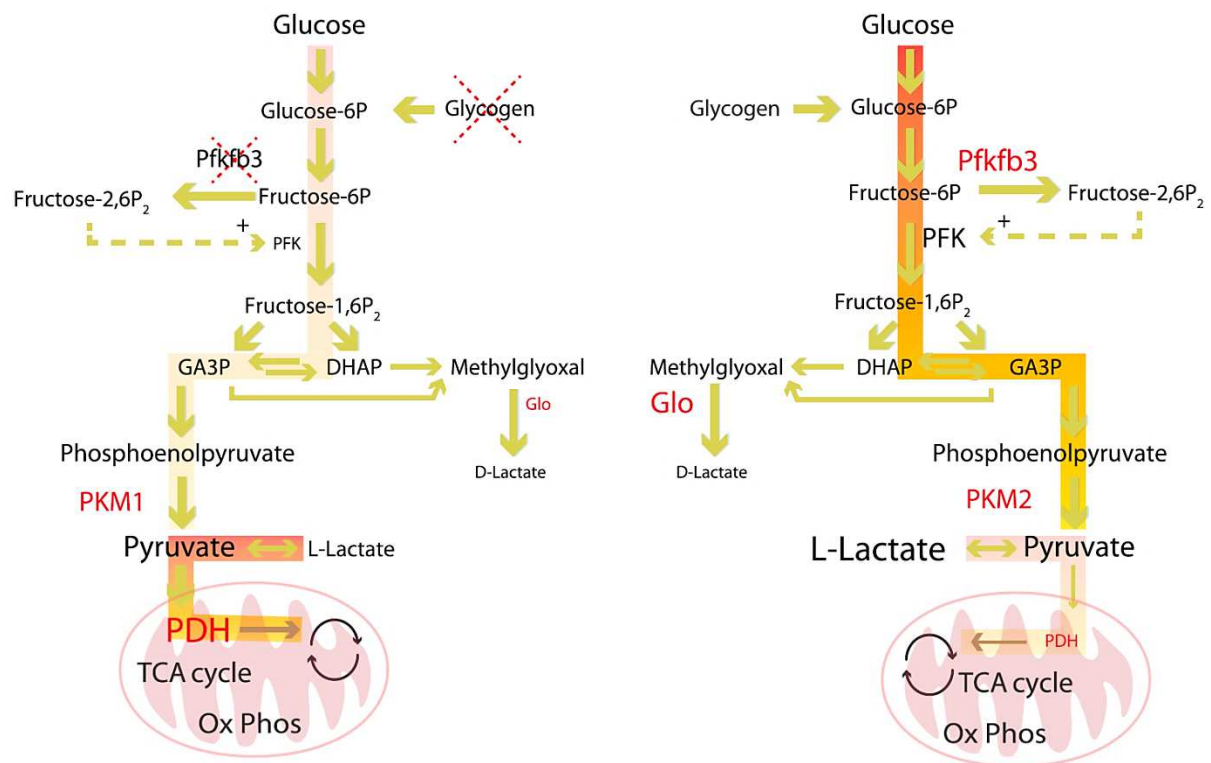


Figure 14. Régulation de la glycolyse dans les neurones et les astrocytes.

Le glycogène n'est stocké que dans les astrocytes. L'activité et l'expression de la PFKFB3 est réduite dans les neurones entraînant une régulation négative de la glycolyse dans ces cellules. La PDH, l'enzyme clef de l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs est hyperphosphorylée et avec une activité réduite dans les astrocytes, favorisant la production de lactate plutôt que d'ATP via le cycle de Krebs. Contrairement aux neurones où la PDH est active et facilite l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. Figure issue de (Magistretti and Allaman, 2015).

Dans les neurones, au contraire des astrocytes, la PFKFB3 est constamment dégradée par le protéasome, empêchant la régulation positive de la glycolyse (**Figure 14**) (Bolanos et al., 2010). Ce mécanisme peut expliquer la différence d'activité glycolytique entre les neurones et les astrocytes. En surexprimant la PFKFB3 dans les neurones, ceux-ci entrent en apoptose (Herrero-Mendez et al., 2009). Dans les neurones, le glucose est principalement métabolisé dans la voie des pentoses phosphate. Cette voie est la principale productrice de NADPH qui permet de régénérer le glutathion et donc de restaurer les capacités anti-oxydantes des neurones. Le flux oxydatif du cycle de Krebs peut être régulé par l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) dont l'activité dépend de son état de phosphorylation.

Plus l'enzyme est phosphorylée et moins elle est active. La PDH est ainsi très phosphorylée dans les astrocytes (**Figure 14**) (Halim et al., 2010). Pour revue (Magistretti and Allaman, 2015).

Les neurones et les astrocytes ont des métabolismes différents, plutôt oxydatif ou glycolytique respectivement, et semblent couplés métaboliquement par l'échange du lactate produit par les astrocytes et transportés dans les neurones.

Dans la MA, l'hypométabolisme observé chez les patients par FDG-PET ne permet pas de savoir quelle est la participation de chaque type cellulaire. Des études *in vitro* suggèrent que l'application d'A β sur des astrocytes entraînerait une augmentation de la capture de glucose, de la glycolyse, de la libération de lactate, de GSH et de la production de glycogène (Allaman et al., 2010). Ce changement métabolique aurait un impact négatif sur la viabilité des neurones. Cette augmentation de la glycolyse peut s'expliquer par une augmentation de l'expression de la PFKFB3 dans les astrocytes cultivés en présence d'A β (Fu et al., 2015). L'inhibition de la PFKFB3 semble aggraver l'accumulation d'A β autour des astrocytes et augmenterait leur vulnérabilité à la toxicité d'A β (Fu et al., 2015). Le statut métabolique des astrocytes peut être perturbé par l'A β et sa modification a des conséquences délétères sur l'accumulation d'A β et la survie neuronale.

f) Maintien de l'homéostasie glutamatergique

L'un des rôles majeurs des astrocytes concerne la régulation de l'homéostasie du glutamate. Les astrocytes sont capables de capter le glutamate libéré dans la fente synaptique lors de l'activité neuronale grâce à l'expression de transporteurs au glutamate de haute affinité GLT1 (EAAT2) et GLAST (EAAT1). Les neurones expriment aussi des transporteurs au glutamate EAAC1 (EAAT3) ou EAAT4. Les transporteurs astrocytaires limitent l'action du glutamate sur les récepteurs pré- et post-synaptiques et diminuent les courants induits par les NMDAR (récepteur N-méthyl-D-aspartate) et AMPAR (récepteur α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acide). Ils préviennent aussi l'activation d'autres synapses excitatrices (spillover) permettant une modulation fine de la transmission synaptique (Huang and Bergles, 2004).

La transmission glutamatergique, si elle n'est pas régulée par les transporteurs au glutamate, peut être toxique pour les neurones (Dong et al., 2009). L'importance des transporteurs au glutamate astrocytaires a été mise en évidence par différentes études de délétion d'un gène codant pour les transporteurs au glutamate. La suppression des gènes GLT1 ou GLAST entraîne des crises d'épilepsie et de l'excitotoxicité (Tanaka et al., 1997, Watase et al., 1998). Alors que la délétion des gènes EAAC1 ou EAAT4 ne produit pas de phénotype majeur, suggérant un rôle mineur des transporteurs neuronaux par rapport aux transporteurs astrocytaires (Huang et al., 2004).

Le glutamate récupéré dans la fente synaptique est métabolisé par l'action de la glutamine synthétase (GS), une enzyme exprimée exclusivement par les astrocytes. La glutamine produite peut ensuite être transférée aux neurones qui la convertissent en glutamate via l'enzyme glutaminase (**Figure 12**). La récupération du glutamate par les astrocytes permet la protection des neurones contre le phénomène d'excitotoxicité et le recyclage du neurotransmetteur grâce au cycle glutamine-glutamate.

Une diminution des transporteurs GLAST et GLT1 a été observée chez les patients atteints de la MA (Chen et al., 2011). Le traitement des astrocytes avec de l'A β entraîne une diminution de l'expression de GLAST et GLT1 et par conséquent une diminution de l'absorption de glutamate (Matos et al., 2008). De plus l'A β active la libération de glutamate par les neurones (Brito-Moreira et al., 2011). Ces deux phénomènes peuvent agir en synergie et provoquer l'excitotoxicité observée dans la MA.

g) La synapse tripartite et la régulation de la transmission synaptique

Les prolongements astrocytaires entourent les synapses (**Figure 6C**) et forment la synapse tripartite avec les éléments pré- et post-synaptiques (Araque et al., 1999). Chaque astrocyte peut interagir avec plus de 140 000 synapses dans l'hippocampe de rat (Bushong et al., 2002). Cette localisation et organisation morphologique particulière pourrait leur permettre de détecter l'activité synaptique via leurs nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs (Porter and McCarthy, 1997). En réponse à l'activité neuronale, les astrocytes peuvent moduler la transmission et la plasticité synaptique. L'activité neuronale induit des signaux calciques astrocytaires à l'origine de la libération de glio-transmetteurs comme le glutamate, l'ATP ou la D-sérine (Hamilton and Attwell, 2010). Ces signaux calciques semblent très localisés au niveau des prolongements astrocytaires (Di Castro et al., 2011, Panatier et al., 2011). Plusieurs études ont disséqué les mécanismes d'activation des astrocytes conduisant aux signaux calciques entraînant la libération de glio-transmetteurs et notamment via les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) qui sont des récepteurs couplés aux protéines G.

L'activation des astrocytes se traduirait par un signal calcique intracellulaire via le récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R). Le glutamate libéré lors de la transmission synaptique pourrait activer les récepteurs glutamatergiques astrocytaires et induire la réponse astrocytaire. Or les expériences menées sur les souris invalidées pour l'IP₃R dans les astrocytes et ne pouvant donc pas médier de réponse calcique, présentent des résultats contradictoires concernant la modulation de la transmission synaptique (Aguilhon et al., 2010, Navarrete et al., 2012). Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes mis en jeu en fonction du type de circuit neuronal, de la région cérébrale et de la localisation des récepteurs sur les éléments pré- et post-synaptiques (Araque et al., 2014). Dans une étude récente, l'équipe de B. Khakh a montré que l'IP₃R ne serait pas le seul récepteur pouvant conduire à la libération de glio-transmetteurs car le récepteur TRPA1 pourrait médier la libération de D-sérine (Shigetomi et al., 2013).

La D-sérine est un glio-transmetteur particulièrement important dans le système nerveux car c'est l'un des co-agonistes des NMDAR. L'activation des NMDAR nécessite le glutamate et la présence d'un co-agoniste (glycine ou D-sérine). Les NMDAR sont des tétramères composés de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 ou GluN3. Les sous-unités GluN2A et GluN2B sont localisées au niveau des récepteurs synaptiques et extrasynaptiques respectivement (Groc et al., 2009). La D-sérine serait le co-agoniste préférentiel des NMDAR synaptiques alors que la glycine serait celui des NMDAR extrasynaptiques (Papouin et al., 2012). Cela pourrait s'expliquer par la plus grande affinité de GluN2A pour la D-sérine. Cette D-sérine peut être libérée par les astrocytes et elle semble nécessaire à la mise en place de la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe des souris (Henneberger et al., 2010).

Cependant le concept de glio-transmission est débattu dans la communauté scientifique. Selon certains, les techniques *in vitro* utilisées dans plusieurs études ne sont pas pertinentes et demandent à être reproduites *in vivo*. Des souris transgéniques dont les astrocytes ne peuvent libérer de glio-transmetteurs ont une potentialisation à long terme (LTP) altérée (Pascual et al., 2005). Cependant une publication récente a montré que ces souris possédaient aussi une inhibition de la libération de vésicules dans les neurones et que l'altération de LTP observée serait dépendante des neurones (Fujita et al., 2014). D'autres études seront nécessaires avant de pouvoir déterminer la contribution de chaque type cellulaire à l'induction de la LTP.

h) Sérine: production et libération

La L-sérine est l'acide aminé à l'origine de la synthèse de glycine et de D-sérine. Sa production est spécifique des astrocytes qui possèdent l'enzyme PHGDH (3-PhosphoGlycérate Déshydrogénase) permettant la diversion du 3-phosphoglycérate du flux glycolytique (**Figure 15**) (Yamasaki et al., 2001, Ehmsen et al., 2013). La L-sérine peut ensuite être convertie en glycine, via l'action de l'enzyme SHMT (Sérine HydroxyMéthyle Transférase) ou en la D-sérine par la SRR (Sérine Racémase) (Wolosker et al., 1999, Ehmsen et al., 2013). La SRR et la SHMT sont présentes à la fois dans les neurones et dans les astrocytes (Wolosker et al., 1999, Miya et al., 2008, Zhang et al., 2014). L'acide aminé D-sérine peut être dégradé par désamination via l'enzyme DAAO (D-Amino Acid Oxidase) (Sacchi, 2013).

Le transport et la libération de D-sérine est un domaine controversé. Un transport dépendant des vésicules a été identifié. Des vésicules de deux tailles différentes, 36nm (Bergersen et al., 2012) et 300nm (Malarkey and Parpura, 2011) ont été identifiées dans les astrocytes. Les vésicules seraient couplées à des V-ATPase permettant la création d'un gradient favorable à l'entrée de D-sérine dans les vésicules (Mothet et al., 2005). Le transport de la L-/D-sérine est aussi assuré par les transporteurs Asc-1 (Na⁺-independent Alanine–Serine–Cysteine Transporter 1) et ASCT (Na⁺-dependent Alanine–Serine–Cysteine Transporter). Le transporteur Asc-1 est un transporteur permettant l'échange entre les compartiments de deux acides aminés, il n'a été observé que dans les neurones (Rutter et al., 2007). Cependant, l'étude transcriptomique de B. Barres révèle une expression d'Asc-1 six fois plus importante

dans les astrocytes que dans les neurones (Zhang et al., 2014). La localisation des transporteurs ASCT1/2 est aussi un sujet de débat. Originellement localisés dans les astrocytes et les neurones, des études montrent l'expression spécifique d'ASCT1 dans les neurones (Yamamoto et al., 2004) alors que d'autres études montrent sa localisation dans les astrocytes (Sakai et al., 2003).

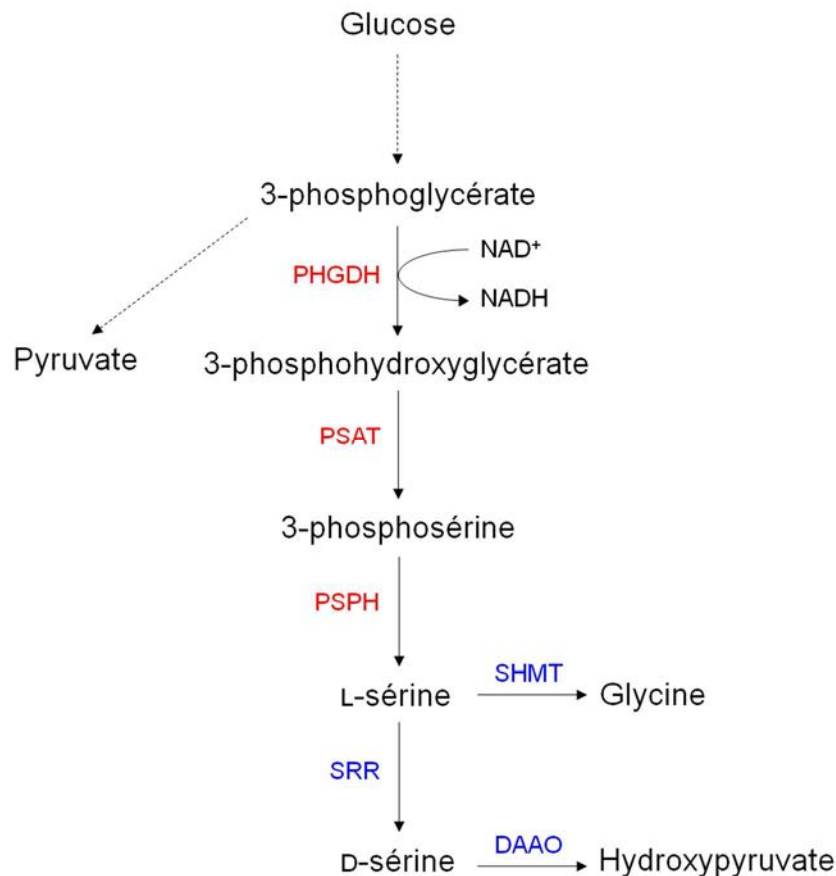


Figure 15. Voies de production de la L-D-sérine et de la glycine.

Les enzymes rouges sont exprimées dans les astrocytes mais pas dans les neurones et les enzymes bleues sont exprimées dans les deux types cellulaires. Abréviations : PHGDH (3-phosphoglycérate déshydrogénase), PSAT (3-phosphosérine amino transférase), PSPH (phosphosérine phosphatase), SHMT (sérine hydroxyméthyl transférase), SRR (sérine racémase) et DAAO (D-amino acide oxydase).

Dans le contexte de la MA, le dosage de la L-D-sérine a été effectué par différents groupes mais des résultats contradictoires ont été obtenus. Une diminution de la quantité de D-sérine mais une augmentation de la L-sérine sont observées par certains (Hashimoto et al., 2004) alors que d'autres observent une augmentation de la D-sérine (Madeira et al., 2015) et que certaines études ne trouvent pas de différences (Nagata et al., 1995). L'application d'Aβ *in vitro* entraînerait l'augmentation de D-sérine (Madeira et al., 2015) mais les mécanismes n'ont pas encore été identifiés.

Les astrocytes sont impliqués dans de nombreuses fonctions cérébrales. En condition pathologique, l'exposition au peptide A β par exemple, les fonctions des astrocytes peuvent être perturbées. Ces perturbations peuvent impacter les neurones (leur survie et la transmission synaptique) à cause des étroites interactions existant entre les neurones et les astrocytes. La transmission synaptique et le métabolisme sont deux fonctions souvent altérées chez les patients atteints de la MA.

Lors de ce projet de thèse, nous avons voulu étudier les interactions entre les neurones et les astrocytes dans la MA. Nous avons essayé de comprendre les liens entre la transmission synaptique et le métabolisme et l'implication des astrocytes dans ces deux fonctions.

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

A. Le modèle de souris 3xTg-AD

1) Les modèles murins de la MA

Afin de mieux comprendre la pathophysiologie de la MA et de pouvoir tester de possibles traitements, il est nécessaire d'avoir des modèles animaux pertinents. Les premiers modèles de souris transgéniques de la MA sont apparus dans les années 90 et la plupart surexpriment une forme mutée de la protéine APP, PSEN1, PSEN2 ou tau. Ces modèles ont tiré parti de l'identification des gènes impliqués dans les formes familiales de la MA. Il existe aujourd'hui plus d'une centaine de modèles de souris de la MA (pour une liste des différents modèles murins de la MA : <http://www.alzforum.org/research-models>). De nombreux modèles ont reproduit le dépôt des plaques amyloïdes ou le développement de DNF mais aucun n'a reproduit les deux signes histopathologiques caractéristiques de la MA. Or, chez les patients, les déficits cognitifs observés sont davantage corrélés à la pathologie tau qu'à la présence de plaques amyloïdes (Dickson et al., 1995, Selkoe, 2002). Le groupe de F. LaFerla a développé en 2003 un modèle de souris triple transgénique exprimant les trois protéines APP/tau/PSEN1 mutées et présentant une double pathologie amyloïde et tau (Oddo et al., 2003b).

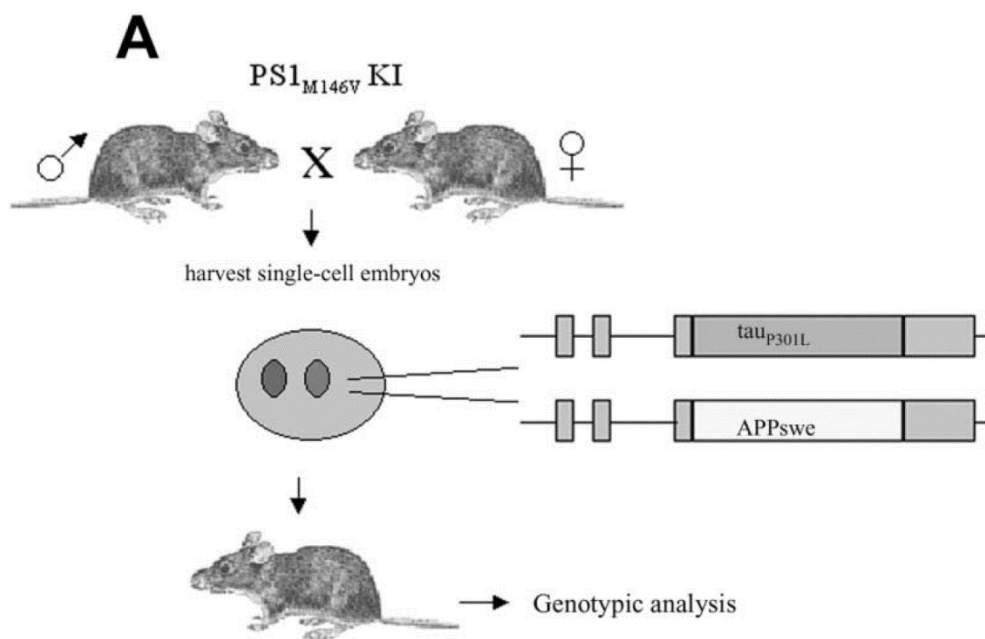


Figure 16. Génération des souris 3xTg-AD par micro-injection de transgènes codant pour τ_{P301L} et APP_{swe} .

Des cellules germinales de souris KI pour le gène PSEN1 portant la mutation M146V ont été micro-injectées avec deux transgènes puis les embryons ont été implantés dans des mères porteuses. Les petits issus de cette gestation ont été génotypés pour identifier les porteurs des trois mutations. Figure de (Oddo et al., 2003b).

Au lieu de croiser des souches de souris exprimant les différents transgènes, l'équipe de F. LaFerla a directement introduit les transgènes mutés de tau et d'APP dans des cellules germinales de souris portant une mutation PSEN1_{M146V}/knockin (KI) (**Figure 16**). Les souris présentent d'abord une pathologie amyloïde puis les DNF apparaissent de façon progressive ce qui rend ce modèle particulièrement pertinent pour l'étude des différents stades de la MA.

2) Les souris 3xTg-AD utilisées lors de ce projet

Les expériences ont été réalisées avec les souris 3xTg-AD développées par l'équipe de F. LaFerla (Oddo et al., 2003b). Ces souris de fond génétique J29/C57Bl6, expriment les transgènes codant pour la protéine mutée murine PS1_{M146V} (knock-in) et les protéines humaines mutées APP_{Swe}, et tau_{P301L} sous le contrôle du promoteur Thy1.2. Les souris 3xTg-AD (#034830) ont été obtenues par le MMRRC. Trois couples de souris ont été mis en reproduction début 2012. Les souris femelles contrôles F2 (#101045), non transgéniques, ont été livrées par la compagnie Charles River pour permettre d'effectuer les premières expériences.

En parallèle, trois couples de souris contrôles F1 (#101043) ont été reçues via Charles River et mis en reproduction pour obtenir des contrôles F2. Elles ont été générées et maintenues sur un fond génétique mixte J29/C57Bl6.

3) Géotypage

Le géotypage a été effectué sur des morceaux de queue prélevés au moment du sacrifice des souris. L'ADN a été extrait puis amplifié par PCR avec l'aide du kit "KAPA Mouse GenotyPing" (Kapa Biosystems). Les amorces suivantes ont été utilisées pour le géotypage :

Gène	Sens amorce	Séquence amorce
APP	Forward	AGGACTGACCACTCGACCAG
	Reverse	CGGGGGTCTAGTTCTGCAT
PS1	Forward	AGGCAGGAAGATCACGTGTTCAAGTAC
	Reverse	CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC

Afin d'identifier la forme mutée de la protéine PS1, une digestion du produit de PCR par l'enzyme BstII (NEB) a été réalisée. Une migration sur gel d'agarose 2% est ensuite réalisée afin de vérifier la taille des fragments amplifiés.

B. Etude du métabolisme cérébral par autoradiographie

1) Principe

Le 2-désoxyglucose (2DG) est un analogue non métabolisable du glucose. Il peut être transporté dans les cellules par les transporteurs du glucose (GLUT1 pour les astrocytes et notamment GLUT3 pour les neurones) et phosphorylé par l'hexokinase 1 en 2DG-6-phosphate non métabolisable qui s'accumule dans la cellule. Nous utilisons une molécule de 2DG radio-marquée par le carbone 14 ($[^{14}\text{C}]$ -2DG) dont nous pouvons mesurer l'accumulation dans le cerveau grâce à la technique de l'autoradiographie. Cette accumulation est le reflet de l'entrée du glucose dans les cellules et de sa phosphorylation par l'hexokinase : c'est donc un index du métabolisme cellulaire (Sokoloff et al., 1977).

2) Protocole

Les expériences d'autoradiographie ont été réalisées sur des souris femelles WT et 3xTg-AD âgées de 6 et 12 mois ($n=9$ ou 10 selon les groupes). Durant les 3 jours précédents l'expérience, les animaux ont été accoutumés à être maintenus immobiles sur un support. Seize heures avant l'expérience les souris ont été mises à jeun. Le jour de l'expérience, elles sont anesthésiées (isoflurane 2%, Forene), pesées et un cathéter veineux fémoral est posé. Les souris ont pu récupérer de l'anesthésie pendant 1h et leur température a été maintenue à 37°C . Elles ont reçu une injection intraveineuse de $[^{14}\text{C}]$ -2DG ($16.5\mu\text{Ci}/100\text{g}$, NaCl 0.9%). Quarante-cinq minutes après l'injection, les souris ont été sacrifiées par injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (Ceva). Le cerveau a été extrait et immédiatement congelé dans de l'isopentane (-40°C). Les cerveaux sont ensuite conservés à -80°C . Des coupes coronales de $20\mu\text{m}$ d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (CM3050S Leica). Une coupe sur deux a été prélevée sur une lamelle de verre et déshydratée sur une plaque chauffée à 40°C . Les lamelles ont ensuite été co-exposées pendant 10 jours sur un film autoradiographique (Kodak Biomax MR), avec des standards radioactifs de $[^{14}\text{C}]$ (146C, American Radiochemical Company).

Les autres coupes ont été colorées au crésyl violet afin d'obtenir des informations sur l'anatomie des coupes cérébrales en révélant les corps de Nissl des neurones.

Après révélation, les films autoradiographiques ont été analysés, en collaboration avec l'équipe de T. Delzescaux, en utilisant la méthode "Statistical Parametric Mapping" (SPM) permettant de comparer voxel à voxel les activités des souris contrôles et 3xTg-AD sans *a priori* régional sur des volumes autoradiographiques reconstruits en 3D (Dubois et al., 2010, Lebenberg et al., 2011).

Pour être reconstruites en 3D, les films autoradiographiques et les coupes colorées au crésyl violet ont été scannées (Image Scanner III; GE Healthcare Europe) en haute résolution, à respectivement 600 dpi (taille de pixel = $42 \times 42 \mu\text{m}^2$) et 1200 dpi (taille de pixel = $21 \times 21 \mu\text{m}^2$) dans le plan. Le traitement des images a été effectué avec le logiciel développé en interne BrainVISA/Anatomist (<http://brainvisa.info/>) (Figure 17).

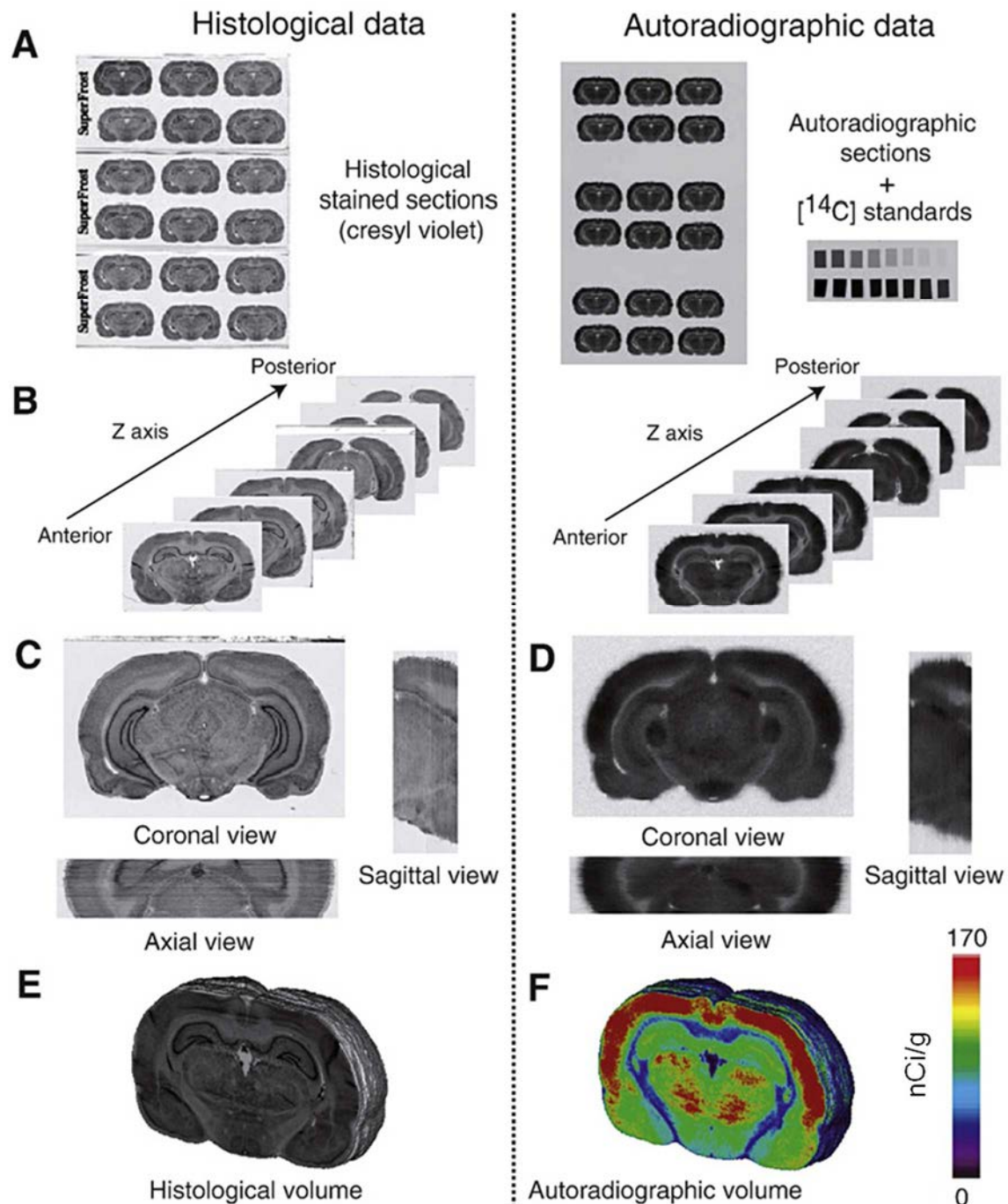


Figure 17. Schéma explicatif de la reconstruction 3D des volumes anatomique et autoradiographique à partir des coupes histologiques et des films autoradiographiques.

A. Coloration des coupes histologiques au crésyl violet **B.C.E.** puis alignement et reconstruction 3D du volume anatomique **D.F.** exposition des films autoradiographiques, alignement des coupes et reconstruction en 3D du volume autoradiographique et conversion des niveaux de gris en activité. Figure modifiée de (Dubois et al., 2008).

Le module BrainRAT du logiciel BrainVISA a été utilisé pour aligner les coupes (transformations séquentielles rigides et affines) ainsi que pour convertir les images.

Tout d'abord, chaque volume anatomique (coupes colorées au crésyl violet) a été reconstruit en 3D (résolution de $21 \times 21 \times 40$ or $21 \times 21 \times 60 \mu\text{m}^3$). Puis, chaque volume autoradiographique a été reconstruit

en 3D (résolution de 42x42x40 or 42x42x60 μm^3) en utilisant comme référentiel géométrique de co-alignement le volume anatomique correspondant.

Les différents niveaux de gris des images autoradiographiques ont été convertis en activité (nCi/g) en utilisant les standards radioactifs de [^{14}C] co-exposés sur les films, puis normalisés à 200 nCi/g.

Avant d'évaluer les différences régionales de consommation de glucose entre les souris 3xTg-AD et les souris WT, les images 3D normalisées ont été sous-échantillonnées afin d'obtenir une résolution de 0,1x0,1x0,1 mm^3 . Une première analyse statistique sur le cerveau entier a été réalisée en utilisant un test de Student bilatéral ($p < 0,01$) (sans correction pour les comparaisons multiples) et une taille de cluster minimum a été fixée à 25 voxel contigus (0,025 mm^3). Une seconde analyse focalisée sur l'hippocampe a ensuite été effectuée.

C. Histologie

1) Fixation et coupe des tissus

Les animaux ont été euthanasiés par une injection létale de pentobarbital puis perfusés en transcardiaque avec une solution de PBS 0,1M contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA). Les cerveaux ont été cryo-protégés dans une solution de 30% de sucrose pendant 24h puis coupés grâce à un microtome. Des coupes coronales ou sagittales de 35 μm d'épaisseur ont été réalisées et conservées à -20°C dans une solution de stockage (PBS 0,1M contenant 30% de glycérol et 30% d'éthylène de glycol).

2) Marquages immuno-histochimiques

Les coupes sont rincées dans du PBS 0,1M et incubées 30min dans du peroxyde d'hydrogène 0,3%. Pour le marquage 4G8, les coupes sont prétraitées 90sec avec de l'acide formique 70%. Après rinçage, les sites non-spécifiques sont saturés par une incubation de 1h dans une solution de saturation (PBS 0,1M, Natural Goat Serum (NGS) 4,5%, TritonX-100 0,2%). Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (**Figure 18**) à 4°C sur la nuit ou pendant 48h sous agitation. Après rinçage, les coupes sont incubées dans l'anticorps secondaire biotinylé (anti-souris ou anti-lapin, Vector Laboratories) pendant 1h. Les coupes sont à nouveau rincées avant amplification du marquage avec un kit avidine-biotine (Vector Laboratories). Le complexe avidine-biotine-peroxydase est incubé 1h puis révélé par le substrat Diaminobenzine (DAB, Vector Laboratories).

Les coupes sont rincées puis montées sur des lames superfrost. Après séchage, les coupes ont été déshydratées par des bains d'alcool et de toluène puis les lamelles montées avec le milieu de montage Eukitt (Sigma).

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution anticorps		
			IHC	IF	WB
4G8	Souris	Signet Covance	1:1000		
Actine	Lapin	Sigma			1:5000
ASCT1	Lapin	Frontier		1:500	
AT180	Souris	Thermo Scientific	1:1000		
AT8	Souris	Thermo Scientific	1:400		
GFAP	Lapin	Dako			1:5000
HT7	Souris	Innogenetics	1:500		
IBA1	Lapin	Wako		1:1000	
NeuN	Souris	Chemicon		1:500	
OC	Lapin	Millipore	1:500		
PHGDH	Cochon d'Inde	Frontier		1:500	
PHGDH	Lapin	Frontier			1:500
SRR	Souris	BD Biosciences			1:1000
Vimentin	Poulet	Abcam		1:1000	

Figure 18. Liste des anticorps et de leur dilution pour les IHC, IF et WB.

Abréviations : immuno-histochimie (IHC), immuno-fluorescence (IF) et western blot (WB).

3) Marquages immuno-fluorescents

Les coupes sont rincées dans du PBS 0,1M et incubées 30min dans une solution de saturation-perméabilisation (PBS 0,1M, NGS 4,5%, TritonX-100 0,2%) afin de saturer les sites non-spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (**Figure 18**) à température ambiante sur la nuit sous agitation. Après rinçage, les coupes sont incubées pendant 3h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Life technologies). Les coupes sont rincées, montées sur des lames superfrost et les lamelles sont posées avec le milieu de montage Fluor Save reagent (Calbiochem).

D. Quantification des marquages immuno-fluorescents et analyse de Sholl

1) Quantification de la valeur moyenne des marquages

Les quantifications des différents marquages ont été réalisées sur des images acquises avec un microscope confocal SP8 (Leica) avec l'objectif 20X et un zoom 2 (taille du pixel : 0,284 x 0,284µm²). Les images étaient soit empilées (13 steps, z-step : 1µm, stack d'intensité maximum), soit prises sur un seul plan et deux champs par région (CA1 ou subiculum sur trois coupes par animal) ont été acquis.

Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Bande de récupération (nm)
DAPI	405	[419-501]
Alexa-488	499	[506-570]
Alexa-594	589	[595-630]
Alexa-633	633	[638-761]

Grâce au laser à lumière blanche pulsée, nous avons utilisé les longueurs d'onde d'excitation optimales des différents fluorophores (entre 470 et 670nm) et nous avons réglé les fenêtres d'émission de façon à récupérer le maximum de signal sans compromettre la spécificité liée à chaque fluorophore. Le signal lié au DAPI a été excité grâce à une diode 405nm (**voir tableau**).

2) Analyse de Sholl et quantification de l'expression de la PHGDH

Les images du double marquage GFAP/PHGDH ont été acquises avec un microscope confocal SP8 (Leica) avec l'objectif 20X et un zoom 2 (taille de pixel : 0,284x0,284 μm^2). Les images ont été empilées (13 steps, z-step : 1 μm , stack d'intensité maximum) puis analysées grâce au logiciel Fiji.

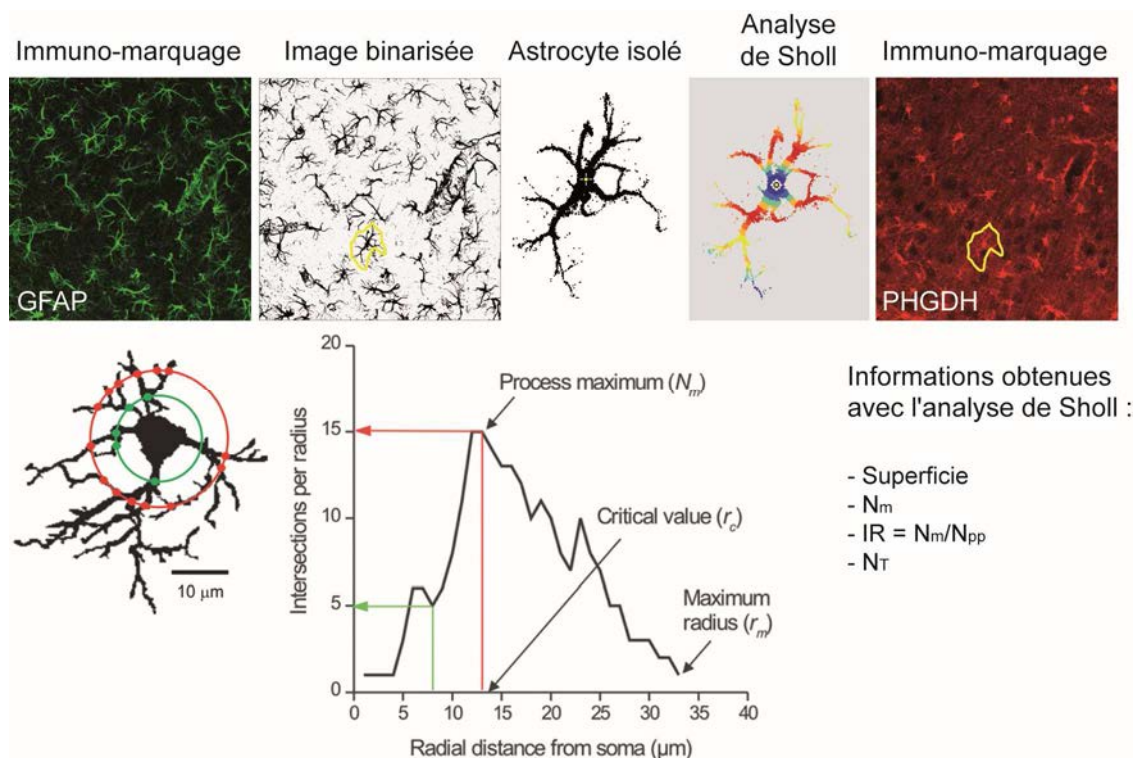


Figure 19. Analyse de Sholl à partir d'un marquage GFAP et mesure de l'expression de la PHGDH. Immuno-marquage permettant la révélation de la GFAP et de la PHGDH, isolation manuelle d'un astrocyte et analyse de Sholl de cet astrocyte. L'analyse de Sholl permet d'obtenir différentes informations concernant chaque astrocyte: sa superficie, son nombre maximum d'intersections (N_m), son nombre de prolongements primaires (N_{pp}), son indice de ramification (IR), la valeur critique (V_c) et son nombre total d'intersections (N_T). La ROI correspondant à chaque astrocyte est reportée sur le marquage PHGDH afin de déterminer son niveau d'expression. Figure modifiée de (Reeves et al., 2011).

Les images du marquage GFAP ont été binarisées (**Figure 19**) et la méthode des cercles concentriques de Sholl (Sholl, 1953) a été utilisée pour déterminer différents index concernant la morphologie des cellules (**Figure 19**). Chaque cellule a été segmentée manuellement afin d'exclure les cellules adjacentes en traçant une région d'intérêt (ROI) autour du soma et des ramifications. Puis, après sélection du centre du soma, l'analyse de Sholl a été réalisée en comptant le nombre d'intersections entre les ramifications des astrocytes et les cercles dont le rayon augmente par incrément de 1 μm depuis le centre du soma. La ROI précédemment définie a été superposée à l'image du marquage PHGDH pour mesurer la valeur moyenne d'intensité du marquage (**Figure 19**). L'index de ramification

(IR) généré par l'analyse de Sholl (correspondant au nombre maximum d'intersections rencontrées divisé par le nombre de prolongements primaires de chaque astrocyte) pour chaque astrocyte et la valeur correspondante d'intensité de marquage de PHGDH ont été mesurés pour chaque groupe.

E. Biochimie

1) Extraction des protéines

Les animaux ont été euthanasiés par une injection létale de pentobarbital. Les cerveaux ont été rapidement extraits et coupés en tranches de 1mm d'épaisseur grâce à une matrice (Ted Pella). Les régions d'intérêt (hippocampe, subiculum et cortex somatosensoriel) ont été disséquées manuellement sous un microscope chirurgical binoculaire (World Precision Instruments) et rapidement congelées dans de la carboglace. Les échantillons ont été conservés à -80°C avant l'extraction des protéines. Une solution de lyse composée de Tris-HCl pH 7.4 50mM, NaCl 100mM, inhibiteurs de protéases 1X (Complete Mini, Roche 11836153001) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 1/100 (Sigma, P5726), a été ajoutée à chaque échantillon (10µl par mg de tissu). Les échantillons sont ensuite soniqués 5 fois pendant 6 sec. La quantité de protéines est dosée à l'aide du kit BCA (Thermo Fisher Scientific). Des aliquots de 50µl ont été directement dilués dans le tampon de charge NuPAGE LDS (4X) avec l'agent réducteur NuPAGE® Sample Reducing agent (10X) (Life technologies) et conservés à -20°C. Le reste des échantillons a été conservé à -80°C.

2) Western blot

Avant la migration, les échantillons sont dénaturés par une incubation de 10min à 75°C puis déposés dans les puits de gels 4-12% Novex NuPage Bis-Tris gel (Life technologies) avec un marqueur de poids moléculaire Spectra BR (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons migrent ensuite à un voltage de 150V pendant 1h environ. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (i-blot transfert stacks nitrocellulose regular, Life Technologies). Les membranes sont colorées au rouge Ponceau pour contrôler la migration et le transfert des protéines. Après rinçage dans une solution de Tris-HCl pH 7.4 25mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,1% (TBS-T), les membranes sont saturées 1h dans une solution de TBS-T 5% lait pendant 1h. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (**Figure 18**) sur la nuit à 4°C dilué dans la solution de TBS-T 5% lait. Après rinçage, les membranes sont incubées 1h avec l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin) couplé à la HRP (horseradish peroxidase) (Vector Laboratories). Les membranes sont rincées et les protéines révélées par chemiluminescence avec le kit Enhanced Chemiluminescence reagent (ECL, GE Healthcare). L'émission de chemiluminescence a été détectée par la caméra du Fusion X2 (Thermo Fisher Scientific).

1) Extraction ARN

2) Synthèse ADNc

3) Real time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

59

Gène	Sens amorce	Séquence amorce
PHGDH	Forward	AAGTTCATGGGGACAGAGCTGAAC
	Reverse	CCTTCACCATGTCCACAACTGGA
Cyclophiline	Forward	ATGGCAAATGCTGGACCAA
	Reverse	GCCTTCTTTCACCTTCCCAA

Figure 20. Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR.

Chaque paire d'amorces a été validée à partir de dilutions en cascade (de 3,5 à 0,028 ng/μl) d'ARN de souris contrôles et l'efficacité de la RT-qPCR a été déterminée. Elles sont comprises entre 80 et 105% pour chaque paire d'amorces.

4) Génération des plasmides

Afin de mesurer la concentration de glucose, lactate et pyruvate à l'échelle cellulaire, nous avons développé des vecteurs viraux permettant l'expression de protéines fluorescentes ou de senseurs de ces métabolites dans des types cellulaires spécifiques. Notre laboratoire utilisait les vecteurs lentiviraux pour cibler des neurones ou des astrocytes. Malheureusement l'expression des transgènes n'était pas suffisante pour permettre des expériences de FRET. Les virus adéno-associés (AAV) sont caractérisés par leur sérotype, qui détermine en partie leur tropisme cellulaire dans le système cérébral. Ils ont l'avantage d'être non-pathogéniques, d'avoir une large zone d'infection et d'induire fortement l'expression de leur transgène. Ces éléments ont conduit à produire des plasmides codant pour différents transgènes et permettant la production de vecteurs AAV.

Les plasmides AAV sont composés d'un transgène sous le contrôle d'un promoteur, le tout entouré d'ITR (Inverted Terminal Repeats) de l'AAV-2 nécessaires à l'encapsidation du plasmide lors de la production virale (**Figure 21**). Des éléments de régulation peuvent aussi être présents comme un élément de régulation post-transcriptionnelle WPRE (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element), une queue poly-adenylée bGHpA (bovine Growth Hormone poly-Adenylation sequence) ou un élément stabilisateur du promoteur (intron de la β-globine) (**Figure 21**).

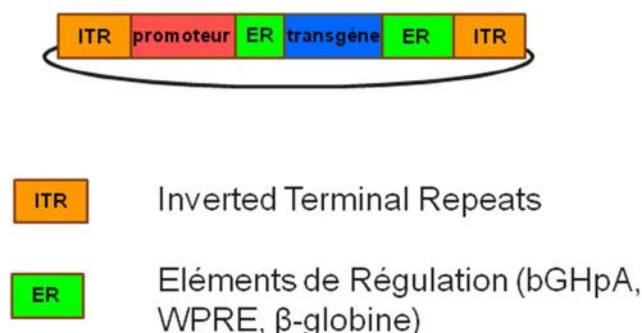


Figure 21. Composition d'un plasmide AAV.

a) La stratégie Gateway

La technologie Gateway (Life Technologies) a été utilisée pour générer les plasmides. Elle permet de créer de nouveaux plasmides par recombinaisons homologues de sites att (**Figure 22**).

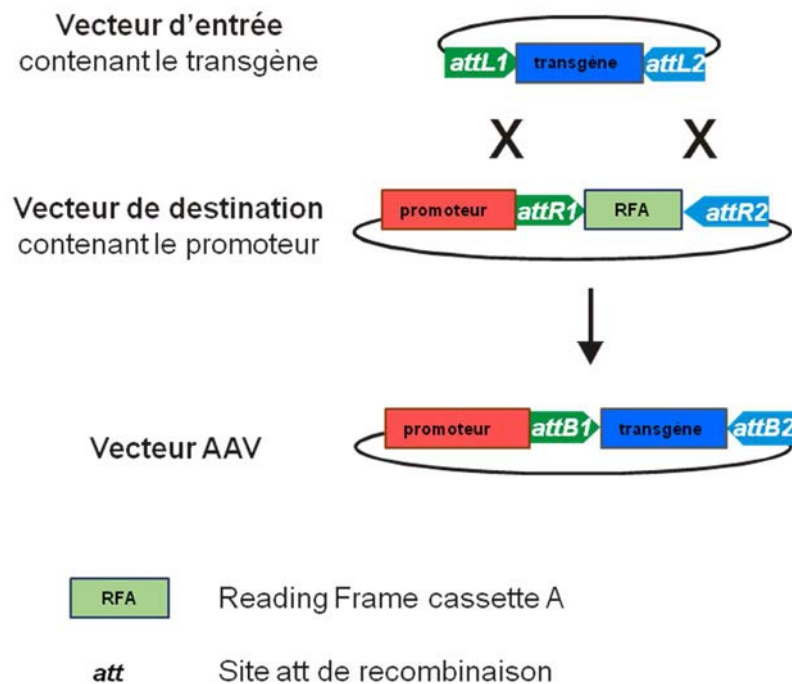


Figure 22. Le système Gateway simple de recombinaison homologue entre plasmides.
Modifiée de Life Technologies.

Plusieurs plasmides d'entrée et de destination ont été créés pour être ensuite combinés afin de générer des plasmides AAV par recombinaison homologue (**Figure 23**).

b) Les plasmides d'entrée

L'ADNc de la td-Tomato (tandem dimer Tomato) a été amplifié par PCR à partir d'un plasmide fourni par J. Livet de l'Institut de la Vision, Paris. Le produit de PCR a été directement cloné dans un TOPO plasmide (Life Technologies) pour produire un plasmide codant pour la td-Tomato entourée de sites att (**Figure 23A**).

Les plasmides exprimant les sondes FRET sensibles au glucose (FLIIP (FLII¹²Pglu700μΔ6)) (#17866), au lactate (Laconic) (#44238) ou au pyruvate (Pyronic) (#51308) sont disponibles sur Addgene. Comme

pour la td-Tomato, les ADNc des sondes ont été amplifiés par PCR et clonés dans un TOPO plasmide (**Figure 23A**).

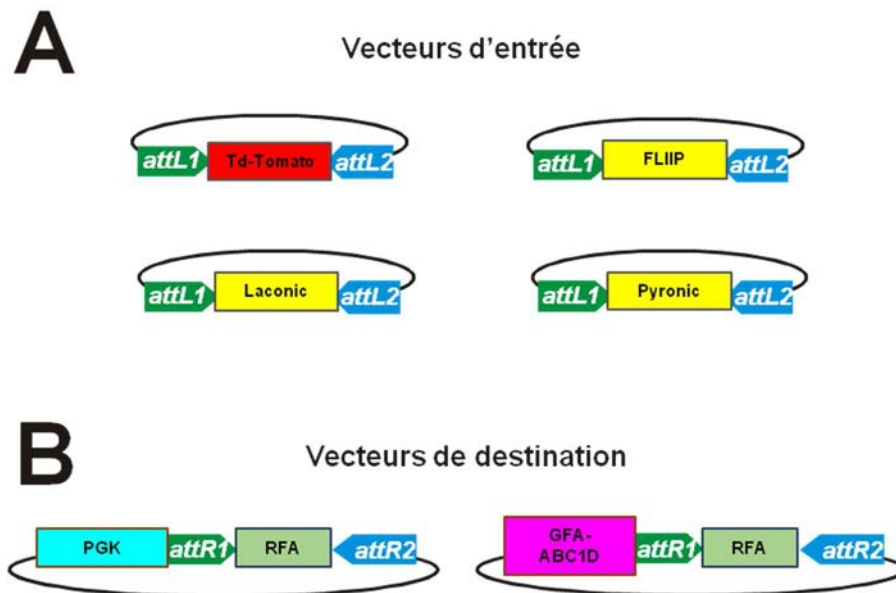


Figure 23. Les plasmides générés et utilisés en combinaison grâce au système Gateway.

c) Les plasmides de destination

Afin de favoriser l'expression des transgènes dans les neurones, le promoteur PGK (Phospho-Glycerate Kinase) a été sous-cloné en amont de la cassette RFA et du site att (**Figure 23B**).

Pour cibler l'expression des transgènes dans les astrocytes, le promoteur couramment utilisé est celui de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) appelé gfa2. Or sa taille (2,2 kb) n'est pas compatible avec les transgènes codant pour les sondes FRET (2,5 kb) car les AAV ne peuvent encapsider un ADN de taille supérieure à 4,7 kb. L'équipe de Michael Brenner (Birmingham, USA) a montré qu'une version optimisée du promoteur de la GFAP, ne faisant que 681pb, possède une activité deux fois plus importante que le promoteur gfa2 (Lee et al., 2008). Nous avons obtenu ce promoteur GFA-ABC1D que nous avons cloné en amont de la cassette RFA et du site att (**Figure 23B**).

d) Les plasmides AAV

Les différents vecteurs d'entrée ont été utilisés en combinaison avec les vecteurs de destination et grâce aux recombinaisons homologues des sites att, des plasmides AAV codant pour les différents transgènes sous contrôle des promoteurs PGK ou GFA-ABC1D ont été générés (**Figure 24**).

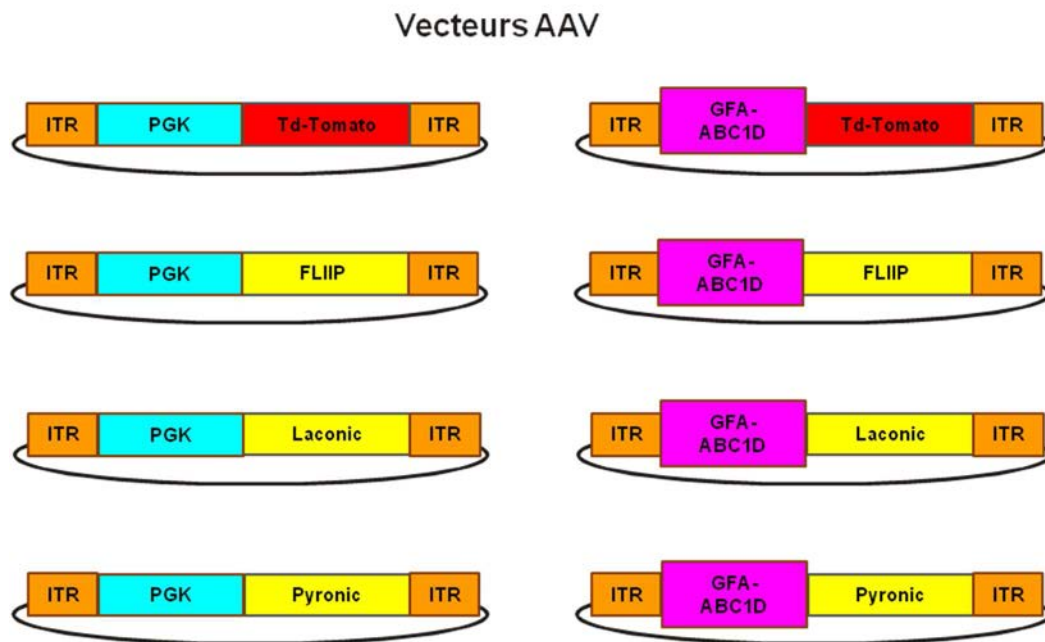


Figure 24. Les plasmides AAV générés exprimant la td-Tomato ou des sondes FRET sensibles à différents métabolites.

5) Production des AAVs

Des plasmides codant pour le promoteur GFA-ABC1D et les différentes sondes FRET ont été générés à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Ils sont identiques aux plasmides générés dans notre laboratoire à MIRCen mais possèdent un élément de régulation en plus, l'intron de la β -globine, qui stabilise le promoteur et augmente l'expression du transgène (Haddad-Mashadrizheh et al., 2009).

A partir des plasmides AAV comportant un promoteur et un transgène, des AAVs ont été produits à MIRCen (Berger et al., 2015). Le sérotype 10 a été utilisé pour générer des AAVs ayant un tropisme neuronal et le sérotype 9 pour obtenir un tropisme astrocytaire.

G. Injections stéréotaxiques

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine (150mg/kg) et de xylazine (10mg/kg). De la lidocaïne (5mg/kg) a été injectée sous la peau du crâne 5min avant le début de la chirurgie. Les coordonnées stéréotaxiques ont été déterminées à partir du Bregma et les coordonnées ventrales mesurées à partir de la dure-mère (**voir tableau**). Les animaux ont reçu une injection stéréotaxique de 2 μ l de virus AAV dilué à 5.10⁹vg/ μ l dans la région CA1 de l'hippocampe ou le cortex via une seringue de 10 μ l Hamilton et une aiguille de 34 gauge. Les virus ont été dilués dans du PBS 0,1M contenant 0,001% d'acide pluronique. L'injection s'est faite à une vitesse de 0,2 μ l/min. A la fin de l'injection,

l'aiguille a été laissée en place pendant 5min avant d'être délicatement retirée. La peau a été recousue et les animaux ont pu récupérer dans une chambre de réveil.

Site d'injection	Cortex	CA1
Coordonnées stéréotaxiques	mm	mm
Barres de gueule	0	0
Antéro-postérieur	-0,7	-2
Latéral	+/-2	+/-2
Ventral	-0,6	-1,2

H. Enregistrements électrophysiologiques

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec S. Oliet, A. Panatier et J. Veran au Neurocentre Magendie de Bordeaux.

1) Préparation des tranches

Des coupes sagittales de 350µm d'épaisseur ont été réalisées à partir de cerveaux de souris entre 7 et 7,5 mois, WT et 3xTg-AD comme précédemment décrit (Panatier et al., 2011). Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (5%) et euthanasiées. Après décapitation, le cerveau a été rapidement prélevé et placé dans du liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) oxygéné (95% d'O₂, 5% de CO₂) maintenu à 4°C. La composition de l'aCSF est la suivante : 125mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 1,25mM de NaH₂PO₄, 1,3mM de MgSO₄, 2mM de CaCl₂, 26mM de NaHCO₃, et 10mM de glucose (pH 7,3; 300-305 mosmol/kg). Un bloc de tissu contenant l'hippocampe est par la suite isolé et des tranches sagittales sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000 et 1200S). Les tranches sont finalement incubées 30min à 32°C puis au moins 1h à température ambiante.

2) Enregistrements électrophysiologiques

Au moment de l'expérience, les tranches sont transférées dans la chambre d'enregistrement à immersion et perfusées avec de l'aCSF (3 mL/min) saturé avec 95% d'O₂ et 5% de CO₂ à température ambiante. La région CA1 de l'hippocampe a été identifiée grâce à un microscope à contraste interférentiel différentiel (Olympus BX50). Les potentiels postsynaptiques excitateurs extracellulaires de champ (fEPSP) ont été enregistrés avec un amplificateur Multiclamp 700B (Axon Instruments Inc.) en utilisant des pipettes (4-5 MΩ) remplies d'aCSF, placées dans le stratum radiatum de la région CA1. Les réponses synaptiques sont isolées à l'aide de picrotoxine (100µM) et évoquées à 0,033 Hz par la stimulation (100µs) des collatérales de Schaffer en utilisant une pipette en verre remplie d'aCSF et placée dans le stratum radiatum (à plus de 200µm des électrodes d'enregistrement). La potentialisation à long terme (LTP) a été induite par application d'un protocole de stimulation à haute fréquence consistant en un train de stimulation de 100 Hz pendant 1 sec, répété trois fois à 20sec d'intervalle. Les

signaux ont été filtrés à 2 kHz et digitalisés à 10 kHz avec le logiciel DigiData 1322 (Axon Instruments Inc.)

3) Analyse des données

Les données ont été analysées grâce au logiciel pClamp (Axon Instruments Inc.). La moyenne des profils des fEPSP a été obtenue après 10min d'enregistrement stable. Les données sont illustrées par la moyenne \pm SEM. La p-valeur des tests statistiques a été placée à $p < 0,05$.

I. Enregistrements FRET

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec B. Cauli et X. Toussay à l'Institut de Biologie Paris-Seine.

1) Préparation des tranches

Trois-quatre semaines après injections stéréotaxiques des virus codant pour les sondes FRET dans le CA1 (**Figure 25**), les souris ont été sacrifiées et leur cerveau placé dans de l'aCSF standard contenant 95% d'O₂, 5% de CO₂, 126mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 1,25mM de NaH₂PO₄, 26mM de NaHCO₃, 2mM de CaCl₂, 1mM de MgCl₂, 10mM de glucose, 15mM de saccharose et 1mM d'acide kinurénique (antagoniste des récepteurs au glutamate). Un bloc de tissu contenant l'hippocampe a été préparé et des tranches sagittales ont été coupées dans l'aCSF standard à l'aide d'un vibratome (Leica). Les tranches ont ensuite été incubées 5 minutes à 35°C dans une solution de chlorure de choline (95% d'O₂, 5% de CO₂, 92mM de chlorure de choline, 2,5mM de KCl, 1,2mM de NaH₂PO₄, 30mM de NaHCO₃, 20mM d'HEPES, 25mM de glucose, 5mM d'ascorbate de sodium, 2mM de thio-urée, 3mM de pyruvate de sodium, 10mM de MgCl₂ et 0.5mM de CaCl₂), puis placées 1h à température ambiante dans l'aCSF standard. Pour l'enregistrement, les tranches ont été transférées dans la chambre d'un microscope droit à platine fixe (Olympus BX51 WI). La chambre est thermostatée à 30°C (Minichamber I, Luigs and Neumann) et perfusée à un débit de 1-2 ml./min avec de l'aCSF à 2.5mM de glucose et dépourvu d'acide kinurénique.

2) Enregistrements du signal FRET

Les tranches sont excitées à 440nm par un système de diodes électroluminescentes (Precise Excite, Cool LED) connecté au port d'épifluorescence du microscope. La sélection des deux types d'images est obtenue grâce à une roue à filtres (Lambda 10B, Sutter Instruments) montée sur le port avant d'émission du microscope et équipée de filtres passe bande pour l'émission de fluorescence de la CFP (HC 483/32 Semrock) et de la YFP (HC 542/27, Semrock). Pendant toute la durée de l'enregistrement un couple d'images CFP et YFP est acquis toutes les 15 s grâce au logiciel Imaging Workbench 6.23 (IndecBiosystem). Durant l'intervalle de temps entre l'acquisition de deux couples d'images de fluorescence, les tranches sont continuellement illuminées à 780 nm par un système de diodes

électroluminescentes (Thorlabs) monté sur le port de transmission du microscope. Les images de transmission infrarouge sont dirigées vers le port arrière d'émission du microscope au moyen d'un miroir dichroïque (725 DCSPXR, Semrock) et visualisées à une fréquence vidéo (25 Hz) grâce à une caméra analogique (ST-70/CE, Sony) connectée à un moniteur. La visualisation en temps réel de l'image infrarouge permet de corriger une éventuelle dérive du plan focal en utilisant des corps cellulaires comme repères visuels. Une ligne de base d'au moins 10 min est observée avant tout changement de composition de l'aCSF. Afin de maintenir une osmolarité constante la réduction de la concentration en glucose de 10mM à 0,2mM de l'aCSF est compensée par une augmentation de la concentration en saccharose.

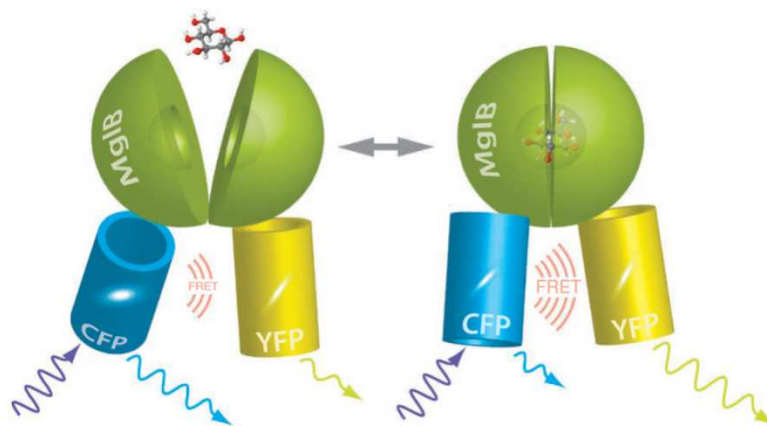


Figure 25. Schéma d'une sonde FRET sensible au glucose.

L'élément sensible à un métabolite (ici la protéine de liaison au glucose MglB) change de conformation en présence de ce métabolite (ici une molécule de glucose). Par excitation de la CFP (Cyan Fluorescent Protein), de l'énergie est transférée à la YFP (Yellow Fluorescent Protein : Venus ou Citrine). À gauche, la sonde FRET en conformation ouverte et à droite, la sonde FRET en conformation fermée. La conformation fermée entraîne une augmentation du transfert d'énergie à l'YFP et donc une augmentation du ratio YFP/CFP. Figure de (Hou et al., 2011)

3) Analyse de données

Des régions d'intérêts correspondant au corps cellulaires des astrocytes sont manuellement délimitées et leurs intensités moyennes mesurées grâce au logiciel ImageJ. Le rapport des intensités moyennes des cellules est alors calculé. Toutes les valeurs données correspondent aux moyennes \pm SEM. La p-valeur des tests statistiques a été placée à $p < 0,05$ (Test U de Mann Whitney).

J. Electrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser (EC-LIF)

1) Extraction des échantillons de cerveaux

Les animaux ont été euthanasiés par une injection létale de pentobarbital. Les cerveaux ont été rapidement extraits et coupés en tranches de 1mm d'épaisseur grâce à une matrice (Ted Pella). Les régions d'intérêt (hippocampe, subiculum et cortex somatosensoriel) ont été disséquées manuellement sous un microscope chirurgical binoculaire (World Precision Instruments) et rapidement congelées dans de la carboglace. Les échantillons ont été conservés à -80°C avant leur préparation. Une solution de lyse composée d'acétonitrile (2:1 v/v) et d'eau a été ajoutée à chaque échantillon (10µl par mg de tissu). Les échantillons sont ensuite soniqués 7 fois pendant 6 sec. Après centrifugation à 5000g pendant 10min à 4°C, les surnageants sont conservés à -80°C.

2) Dérivation et dosage de la L-/D-sérine des échantillons

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec les Dr M. Taverna et T. Tran-Maignan à l'institut Galien de Châtenay-Malabry et Pierrick Jego (post-doctorant au laboratoire).

L'électrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser (EC-LIF) est une technique analytique performante pour séparer et doser des acides aminés dans des échantillons biologiques. Elle possède une très grande sensibilité par rapport aux autres techniques comme l'HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) ou la chromatographie gazeuse. Elle est également très adaptée à la sélection chirale et ne nécessite que de petits volumes, ce qui est un avantage dans le contexte des dosages neurochimiques. La technique utilisée pour séparer et doser la L- de la D-sérine est celle publiée par (Lorenzo et al., 2013) et se base sur la β -cyclodextrine..

I. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel Statistica (Statsoft). Pour comparer deux groupes expérimentaux (WT et 3xTg-AD par exemple), un test de Student a été réalisé. Pour comparer la corrélation entre deux jeux de données (index de ramification et expression de la GFAP par exemple), un test de régression linéaire a été effectué. Un test du χ^2 a été fait pour comparer la distribution d'un jeu de données entre deux groupes (étude de la distribution de l'index de ramification entre les souris 3xTg-AD et WT par exemple).

RESULTATS

III. Résultats

A. Caractérisation des souris 3xTg-AD : un modèle de la maladie d'Alzheimer

Les souris 3xTg-AD expriment trois transgènes codant pour les protéines mutées PS1^{M146V}, APP^{Swe}, et tau^{P301L} (Oddo et al., 2003b). Ces souris développent progressivement des plaques amyloïdes et des DNF ainsi que des déficits synaptiques. Nous avons mené une étude immuno-histologique et électrophysiologique afin de caractériser notre colonie de souris 3xTg-AD.

1) Caractérisation génétique des souris

Utilisant la technique de PCR, nous avons tout d'abord vérifié l'expression des transgènes codant pour les protéines APP et PS1 dans nos souris.

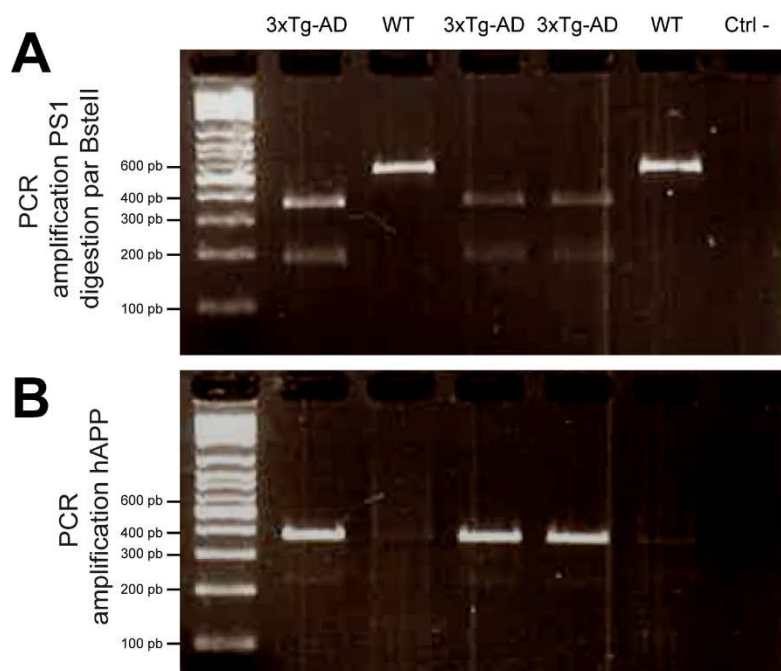


Figure 26. La PCR montrant l'expression de la protéine PS1 mutée seulement chez les souris 3xTg-AD et la protéine humaine APP.

Toutes les souris expriment la protéine murine de la PS1 mais seules les souris 3xTg-AD expriment la forme mutée de la protéine que nous pouvons visualiser par la présence de deux bandes à 350 et 180 paires de bases (pb) (**Figure 26A**). Les souris 3xTg-AD possèdent aussi le gène codant pour l'APP humaine indiqué par la présence d'une bande à 377pb (**Figure 26B**). Nous n'avons pas effectué d'amplification du gène codant pour la protéine tau humaine car les gènes APP et tau des souris 3xTg-AD se sont intégrés dans le même locus.

2) Caractérisation immuno-histologique des souris 3xTg-AD

a) Choix des anticorps

Pendant l'établissement de la colonie, Emilie Faivre (post-doctorant au laboratoire) a effectué une caractérisation histopathologique préliminaire de ces souris et a notamment testé différents anticorps reconnaissant les protéines APP et tau. Les anticorps 4G8 et OC reconnaissent différentes formes du peptide amyloïde- β . Alors que l'anticorps OC reconnaît les formes oligomériques et les plaques, l'anticorps 4G8 peut aussi reconnaître le peptide A β (**Figure 27**). A 6 mois, la pathologie amyloïde n'est détectée que par l'anticorps 4G8 dans la région du subiculum.

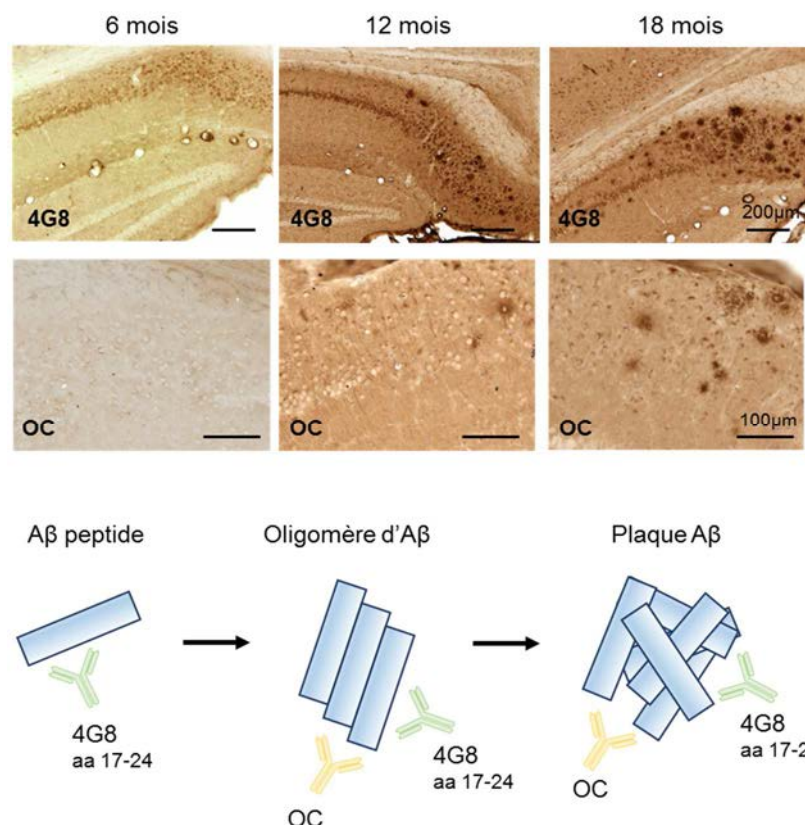


Figure 27. Schéma représentant les anticorps 4G8 et OC ainsi que leur site de reconnaissance du peptide amyloïde- β .

L'anticorps HT7 reconnaît la protéine tau quel que soit son état de phosphorylation (**Figure 28**). Il existe de nombreux anticorps reconnaissant la protéine tau et notamment des anticorps interagissant avec la protéine tau lorsqu'elle est phosphorylée aux niveaux de différents acides aminés. Certaines phosphorylations n'apparaissent que très tardivement dans le développement de la pathologie. C'est le cas de la phosphorylation de la S212-T214, visualisée grâce à l'anticorps AT100, observable seulement à 18 mois chez les souris 3xTg-AD (**Figure 28**). L'anticorps AT180 reconnaît la protéine tau lors d'un état de phosphorylation intermédiaire, de même pour l'anticorps AT8 (**Figure 28**).

Ces résultats préliminaires ont permis de choisir les anticorps 4G8 et AT8 afin de caractériser de façon systématique le modèle de souris 3xTg-AD.

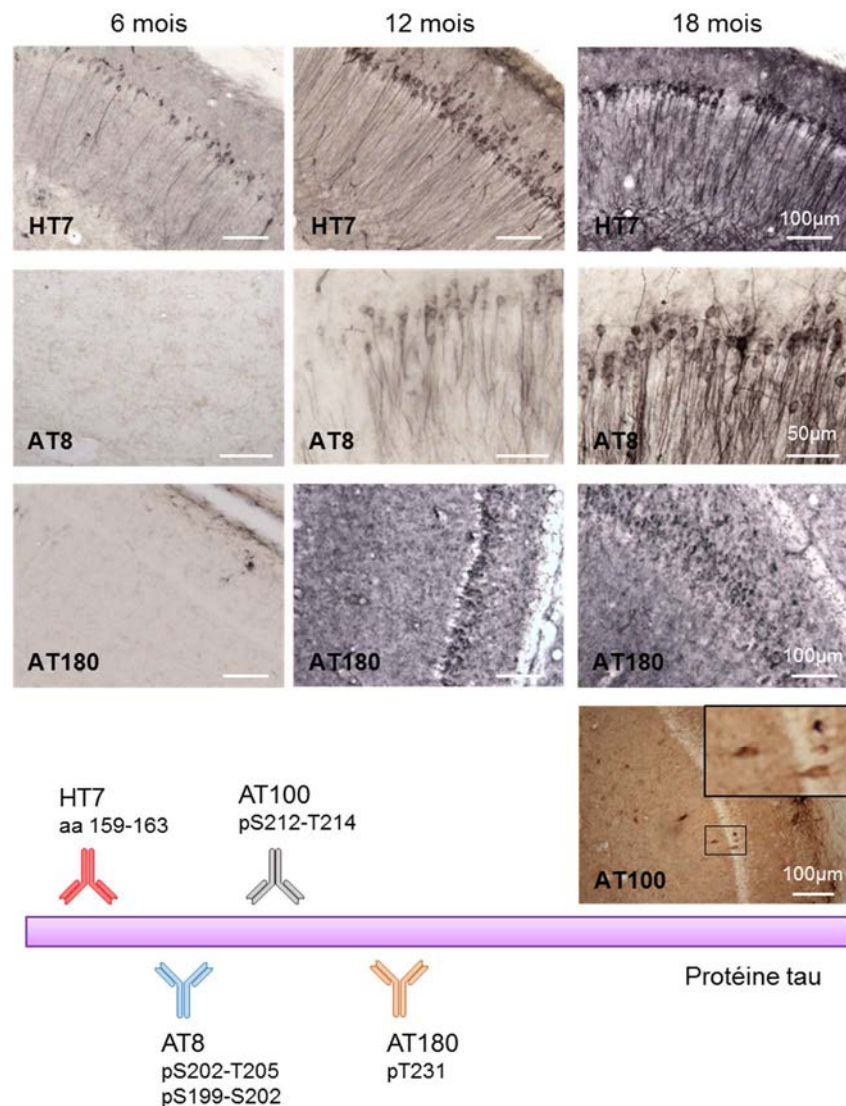


Figure 28. Schéma représentant les anticorps HT7, AT8, AT180 et AT100 et les épitopes de la protéine tau avec lesquels ils interagissent.

b) Les différences entre les mâles et les femelles 3xTg-AD

Les chercheurs ayant développé ce modèle n'observent pas de différences liées au sexe (Oddo et al., 2003b) mais d'autres équipes utilisant ces souris ont par la suite montré une pathologie amyloïde plus prononcée chez les femelles (Hirata-Fukae et al., 2008, Overk et al., 2013). C'est pourquoi nous avons voulu caractériser notre colonie afin de connaître ses caractéristiques et ses différences potentielles par rapport au modèle d'origine.

Nous avons observé que les souris 3xTg-AD femelles de notre colonie présentent une pathologie amyloïde plus prononcée que les mâles à 6 et 12 mois (**Figure 29**). A 6 mois, les souris femelles 3xTg-AD expriment plus d'amyloïde- β que les mâles. Des plaques séniles apparaissent chez les femelles 3xTg-AD dès l'âge de 12 mois alors que les mâles ne présentent qu'une accumulation intra-neuronale d'A β au même âge. Ces résultats montrant une pathologie plus agressive chez les femelles 3xTg-AD, nous ont inclinés à leur prêter une attention particulière dans la suite de cette étude.

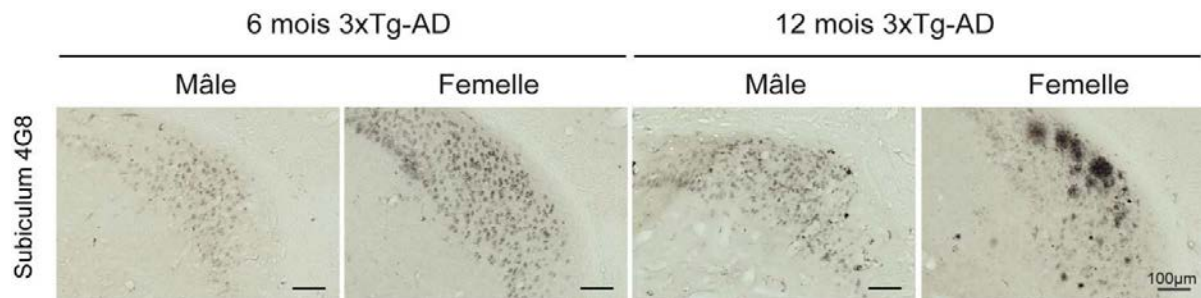


Figure 29. Les femelles 3xTg-AD présentent une pathologie amyloïde plus prononcée que les mâles.

Des coupes de tissus de souris mâles et femelles 3xTg-AD âgées de 6 et 12 mois ont été marquées par immuno-histochimie avec l'anticorps 4G8 pour révéler la protéine APP.

Afin d'évaluer la progression des marqueurs histopathologiques de la MA dans les souris 3xTg-AD femelles, nous avons effectué une analyse à 6 et 12 mois sur des coupes sagittales de cerveau, ce qui permet d'observer un grand nombre de régions cérébrales d'intérêt comme l'hippocampe, le subiculum et l'amygdale sur une même coupe (**Figure 30**).

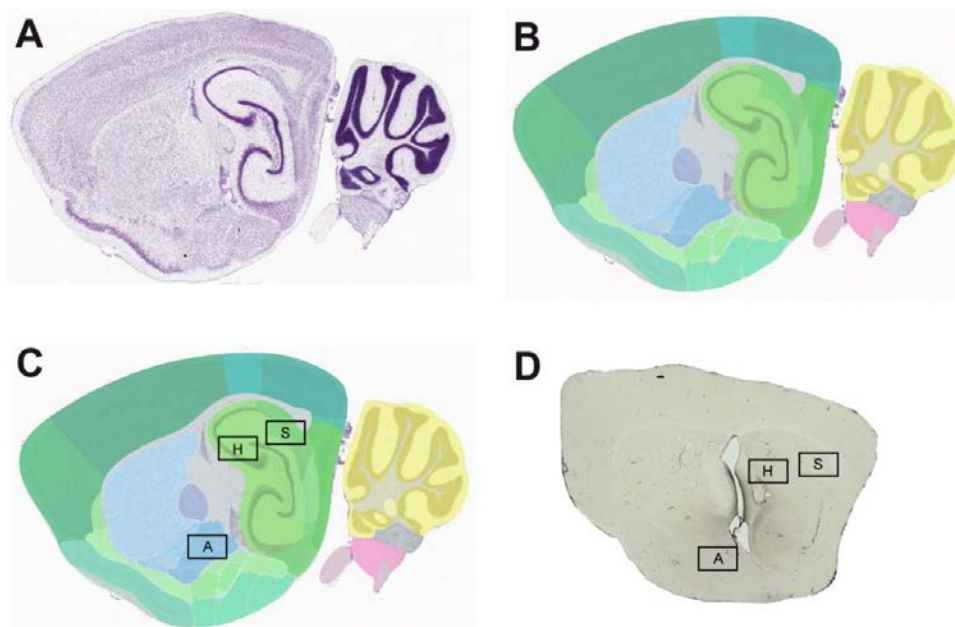


Figure 30. Schéma des coupes sagittales.

A. Marquage au crésyl violet d'une coupe sagittale. **B.** La même coupe avec un code couleur montrant les différentes régions et en **C.** les régions que nous avons principalement étudiées. **D.** Un exemple de coupe sagittale de souris contrôle après un marquage 4G8. Abréviations: S (Subiculum), H (Hippocampe) et A (Amygdale). Image crésyl et schéma de <http://atlas.brain-map.org/>.

c) *Caractérisation histopathologique des souris femelles 3xTg-AD dans différentes régions cérébrales*

La pathologie amyloïde est présente chez les souris 3xTg-AD dès l'âge de 6 mois dans la partie CA1 de l'hippocampe, le subiculum et l'amygdale (**Figure 31**). De l'amyloïde intra-neuronale est observée à cet âge-là. Les premières plaques amyloïdes apparaissent dans le subiculum et l'amygdale à l'âge de 12 mois.

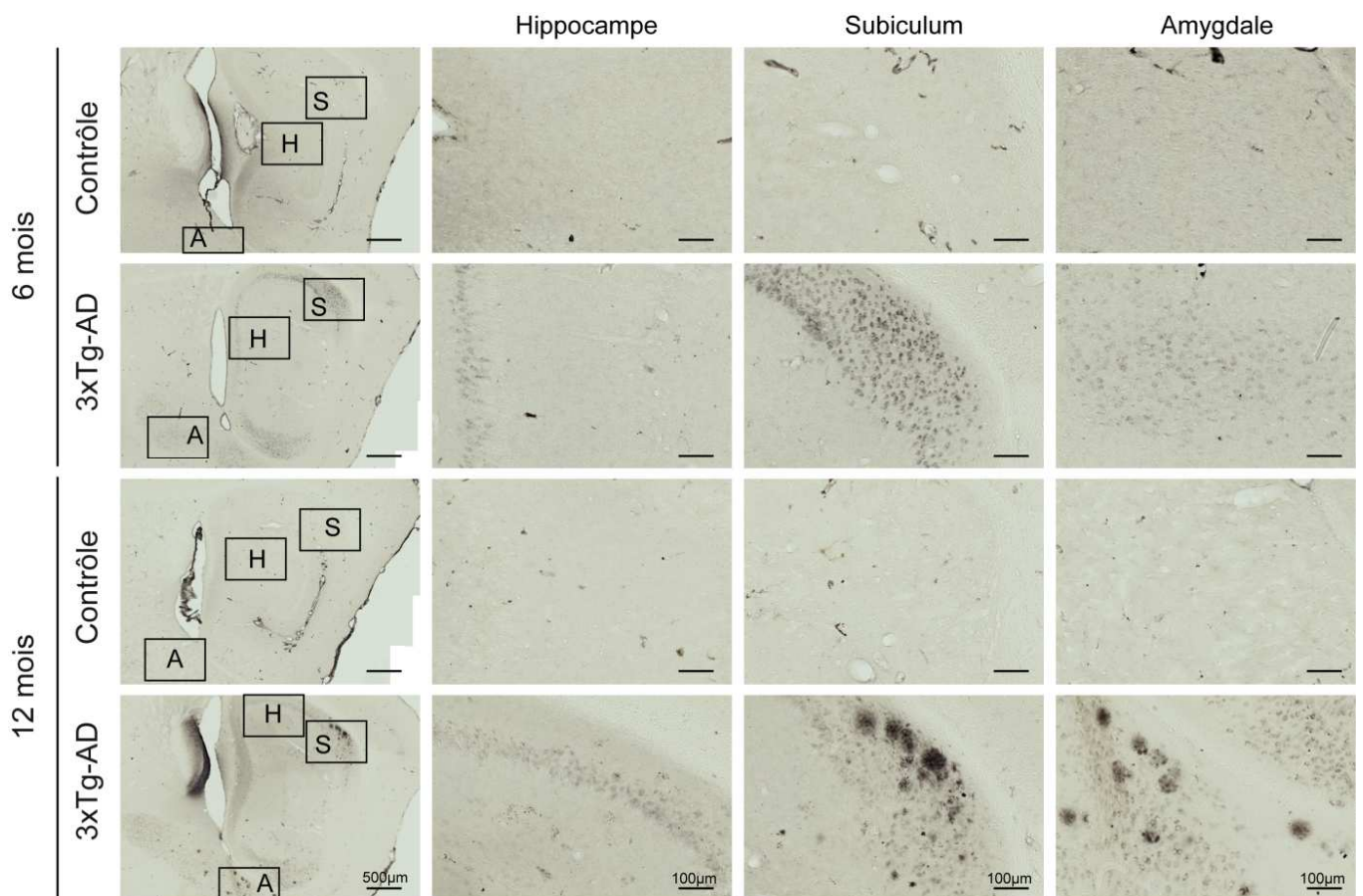


Figure 31. Expression d'amyloïde dans l'hippocampe, le subiculum et l'amygdale des souris femelles 3xTg-AD.

Des coupes de tissus de souris femelles 3xTg-AD ou contrôles âgées de 6 et 12 mois ont été marquées par immuno-histochimie avec l'anticorps 4G8 pour révéler la protéine APP. Abréviations: S (Subiculum), H (Hippocampe) et A (Amygdale).

Contrairement à la pathologie amyloïde, la pathologie tau des souris 3xTg-AD a une progression et une localisation différentes. La protéine tau hyperphosphorylée est présente à l'âge de 12 mois dans le CA1 de ces souris mais dès l'âge de 6 mois dans le subiculum (**Figure 32**).

L'amygdale et l'hippocampe (CA1 et subiculum) font partie du système limbique et sont impliqués dans l'apprentissage et la consolidation de la mémoire. Ces deux structures sont principalement touchées dans la MA par la présence de plaques séniles, de DNF (Braak and Braak, 1991) et par une atrophie sévère (Laakso et al., 1995). Trouver une pathologie amyloïde et tau dans ces structures souligne la

pertinence du modèle 3xTg-AD pour l'étude de la MA. Le développement lent et progressif des pathologies amyloïde et tau dans ce modèle permet l'étude de mécanismes précoces de la MA.

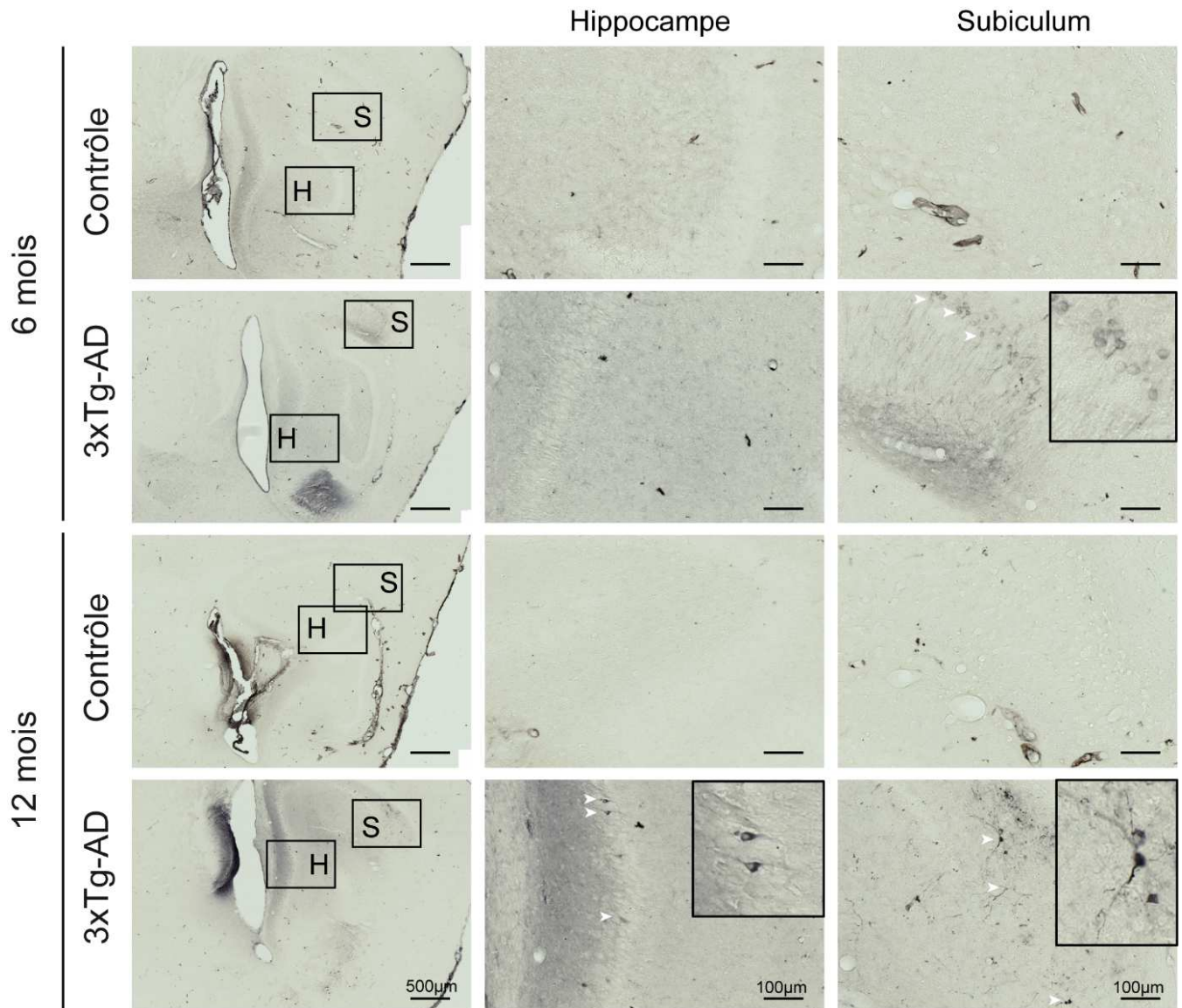


Figure 32. Expression de tau hyperphosphorylée dans le subiculum et l'hippocampe des souris femelles 3xTg-AD.

Des coupes de tissus de souris femelles 3xTg-AD ou contrôles âgées de 6 et 12 mois ont été marquées par immuno-histochimie avec l'anticorps AT8 pour révéler la protéine tau hyperphosphorylée. Abréviations: S (Subiculum) et H (Hippocampe).

Les caractéristiques histopathologiques de la MA se développant d'abord dans le subiculum et l'hippocampe des souris 3xTg-AD, nous nous sommes particulièrement intéressés à ces régions dans le reste de cette étude et nous avons ainsi évalué l'activation astrocytaire et microgliale dans ces régions par une étude histologique.

3) Caractérisation de l'inflammation des souris 3xTg-AD

a) Etude par immuno-fluorescence de l'activation astrocytaire et microgliale

L'activation est un mécanisme de défense mis en places par les cellules astrocytaires et microgliales dans un contexte pathologique. Cette activation s'accompagne généralement de changements morphologiques, moléculaires et fonctionnels (Sofroniew, 2015). Les cellules microgliales sont considérées comme étant les macrophages du cerveau et permettraient l'élimination des plaques amyloïdes (El Khoury et al., 2007). Dans la MA, la présence de plaques amyloïdes et de DNF est corrélée à l'activation des astrocytes et des cellules microgliales (Nagele et al., 2004). Nous avons étudié l'activation astrocytaire et microgliale dans les souris 3xTg-AD à 6 et à 12 mois.

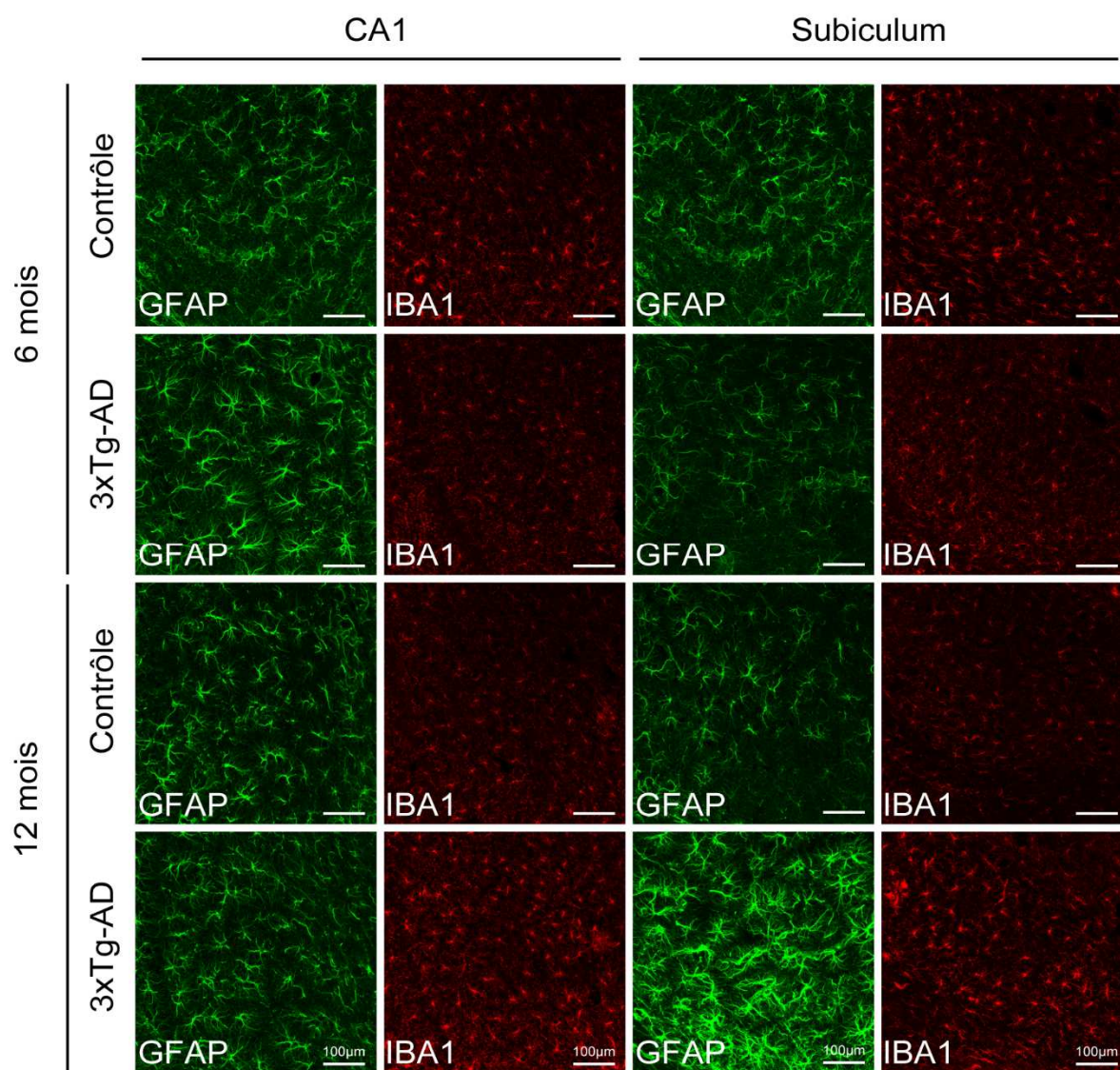


Figure 33. Expression des marqueurs GFAP et IBA1 dans le CA1 et le subiculum des souris 3xTg-AD.

Des coupes de tissus de souris femelles 3xTg-AD ou contrôles âgées de 6 et 12 mois ont été marquées par immuno-fluorescence avec les anticorps anti-IBA1 et anti-GFAP pour visualiser l'activation microgliale et astrocytaire respectivement.

Les souris 3xTg-AD ne présentent pas d'activation astrocytaire ou microgliale à 6 mois mais nous pouvons observer une forte activation astrocytaire du subiculum des souris âgées de 12 mois avec l'augmentation de l'expression de la GFAP (**Figure 33**). Cette réactivité astrocytaire est parallèle à l'apparition de plaques amyloïdes dans cette région et elle s'accompagne d'une activation des cellules microgliales visualisée par l'expression plus importante du marqueur IBA1 (**Figure 33**).

A 6 mois, les souris 3xTg-AD ne présentent pas de plaques amyloïdes mais de l'amyloïde intraneuronale. Cette présence d'amyloïde intraneuronale pourrait entraîner une réaction astrocytaire plus subtile et non détectable par simple immuno-fluorescence. En effet, dès l'âge de 3 mois, une étude a montré que les astrocytes des souris 3xTg-AD présentent des modifications de leur morphologie et cela avant même l'apparition des signes anatomopathologiques associés à la MA (Rodriguez et al., 2009). Pour étudier l'activation astrocytaire de façon plus détaillée et plus quantitative, nous avons effectué une analyse de Sholl cellule par cellule.

b) Analyse de Sholl pour l'étude de l'activation astrocytaire

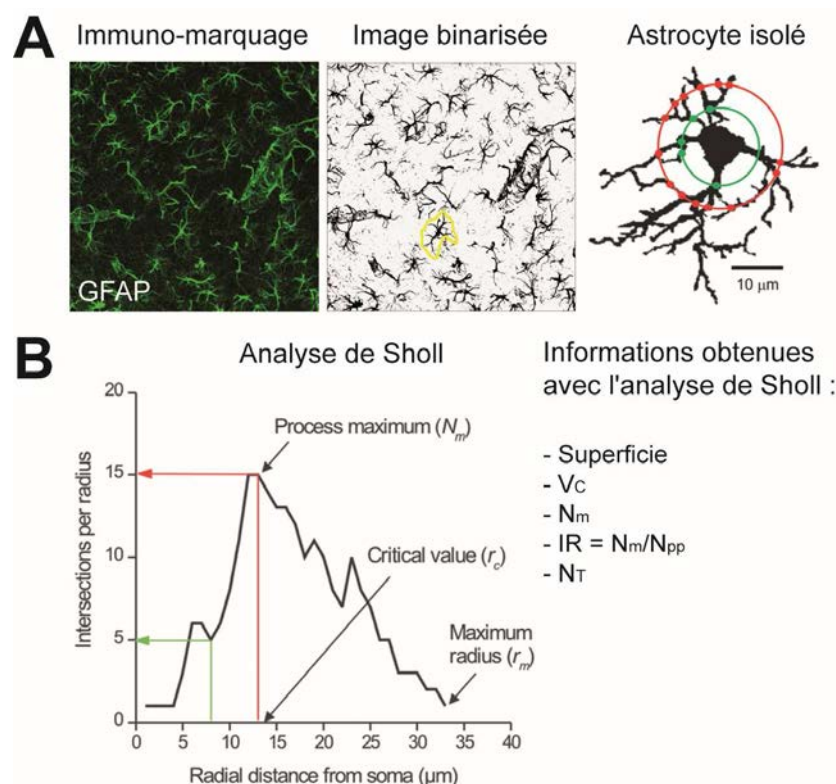


Figure 34. Analyse de Sholl et les indices obtenus.

L'analyse de Sholl permet d'obtenir différentes informations concernant chaque astrocyte: volume, nombre maximum d'intersections (N_m), valeur critique (V_c), nombre de prolongements primaires (N_{pp}), indice de ramification (IR) et nombre d'intersections total (N_T). Figure modifiée de (Reeves et al., 2011).

L'analyse de Sholl est une méthode d'analyse quantitative des caractéristiques morphologiques d'une cellule. Elle est effectuée en comptant le nombre d'intersections de prolongements des astrocytes avec des cercles concentriques de diamètre croissant tracés à partir du centre de la cellule (**Figure 34A**). Cette analyse fournit de nombreux index permettant de caractériser la morphologie d'une cellule comme sa superficie, sa valeur critique ou encore son index de ramification (**Figure 34B**).

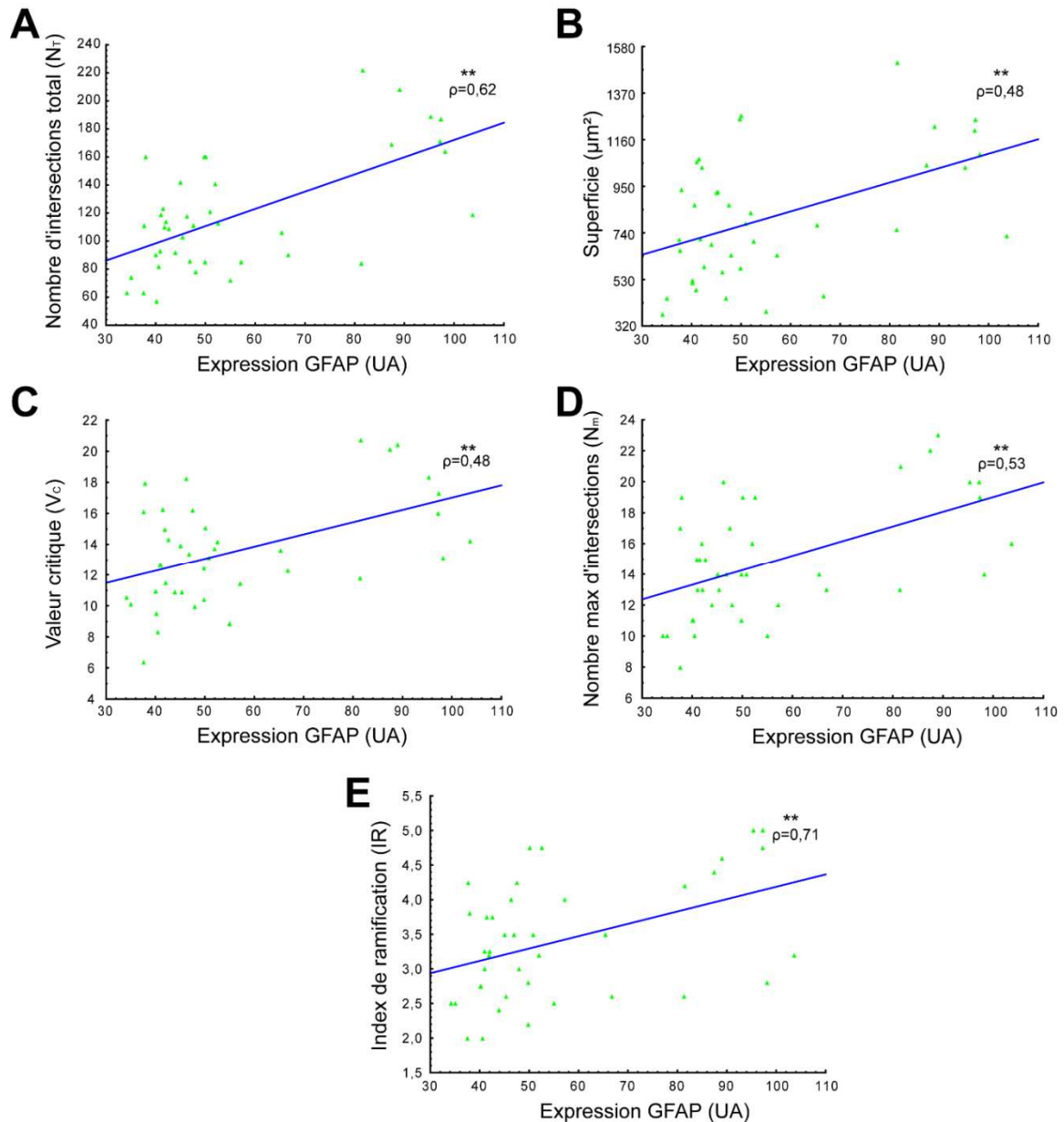


Figure 35. Les différents index de l'analyse de Sholl sont corrélés à l'expression de la GFAP.

A. Le nombre total d'intersections (N_T)

B. la superficie

C. la valeur critique (V_c)

D. le nombre maximum d'intersections (N_m)

Et **E.** l'index de ramification (IR)

sont tous corrélés à l'expression de la GFAP (UA = unité arbitraire). Test de corrélation de Pearson, p -valeur $< 0,01$ **, ρ =valeur du coefficient de corrélation.

Nous avons tout d'abord montré que l'analyse de Sholl réalisée à partir de l'expression de la GFAP fournit des indices pertinents pour l'étude de la morphologie des astrocytes et que l'expression de la GFAP est corrélée aux différents index obtenus après l'analyse de Sholl. Tous les indices étant fortement corrélés à l'expression de la GFAP (**Figure 35**), nous avons choisi d'étudier uniquement la superficie et l'index de ramification (IR) (proportionnel au nombre d'intersection maximum (N_m) et au nombre de prolongements primaires (N_{pp})) pour le reste de l'étude.

Cette analyse de Sholl préliminaire démontre que l'augmentation de la GFAP, liée à l'activation des astrocytes, est associée à des changements morphologiques quantifiables. L'IR et la superficie des cellules sont de bons paramètres de caractérisation morphologique des astrocytes.

c) Etude par analyse de Sholl de l'activation astrocytaire des 3xTg-AD

La région CA1 de l'hippocampe et le subiculum des souris 3xTg-AD ont été analysés par Sholl à l'aide d'un marquage GFAP pour identifier les différences morphologiques des astrocytes de ces régions. Deux paramètres ont été étudiés : l'index de ramification (**Figure 36**) et la superficie (**Figure 37**) des astrocytes à 6 et 12 mois.

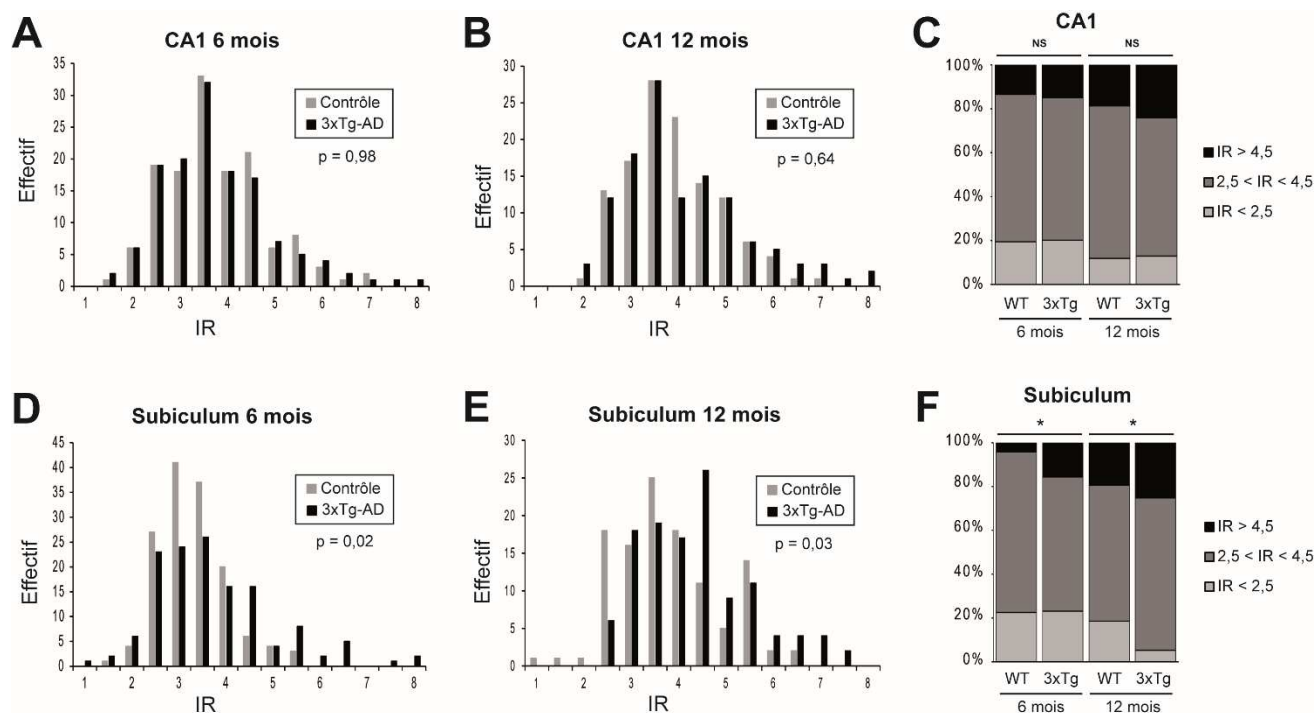


Figure 36. Distribution de l'index de ramification (IR) des astrocytes des souris 3xTg-AD.

Analyse de Sholl de tissus immuno-marqués pour révéler la GFAP de souris 3xTg-AD et contrôles (A. B. C. CA1 : WT 6mois, n=136, WT 12 mois n=120, 3xTg-AD 6 mois n=135, 3xTg-AD 12 mois n=120; D. E. F. subiculum : WT 6mois, n=143, WT 12 mois n=114, 3xTg-AD 6 mois n=135, 3xTg-AD 12 mois n=120). UA = unités arbitraires. Statistiques : test du χ^2 , * $p < 0,05$, NS=non significatif.

Index de ramification (Figure 36)

- Région CA1

A 6 et 12 mois, les astrocytes des souris 3xTg-AD ne sont pas morphologiquement différents de ceux des contrôles dans le CA1 (Figure 36A,B,C) malgré la présence d'amyloïde intra-neuronale à ces âges.

- Région subiculum

A 6 et 12 mois, les astrocytes des souris 3xTg-AD ont une distribution de leur IR significativement différente de celle des contrôles, leur IR est globalement plus élevé (Figure 36D,E). A 6 mois, une augmentation de la proportion des astrocytes ayant un IR > 4,5 par rapport aux contrôles est observée (Figure 36F). A 12 mois, ce phénomène est encore plus marqué car il est accompagné d'une diminution de la proportion des astrocytes ayant un IR < 2,5 (Figure 36F).

Seuls les astrocytes du subiculum des souris 3xTg-AD ont une morphologie plus complexe que les souris contrôles.

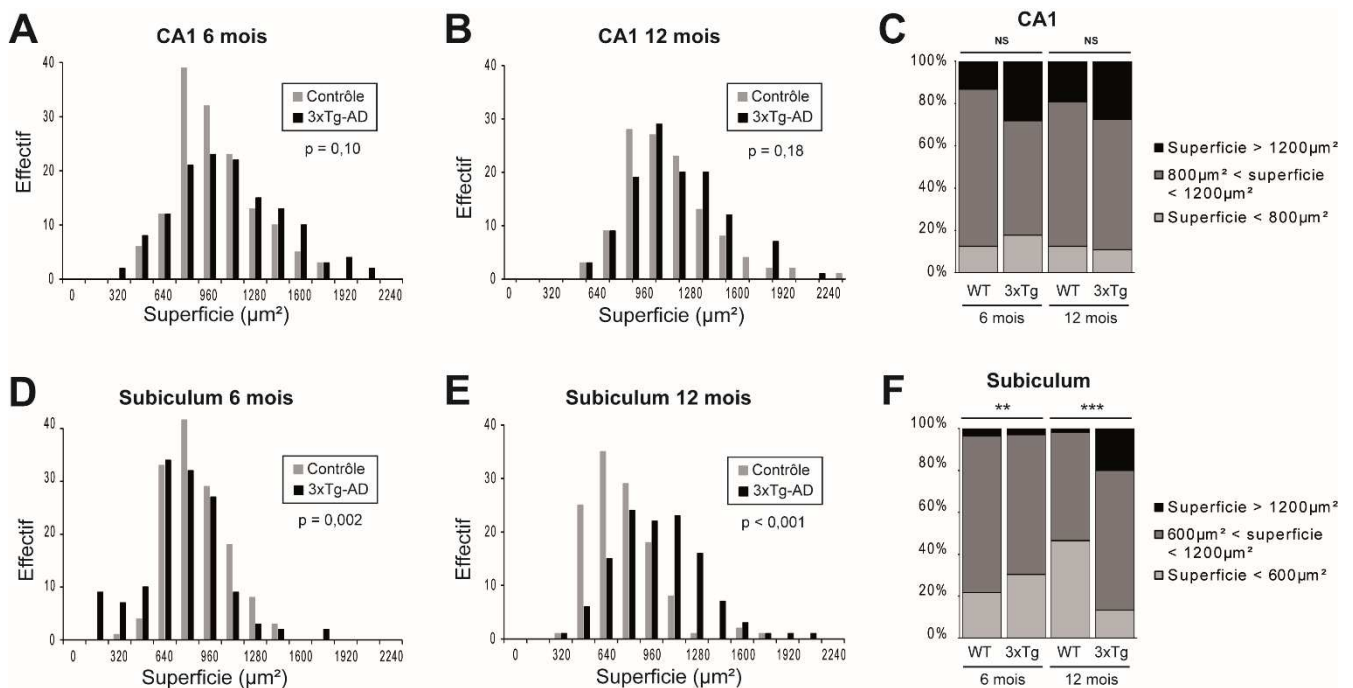


Figure 37. Distribution de la superficie des astrocytes des souris 3xTg-AD.

Analyse de Sholl de tissus immuno-marqués pour révéler la GFAP de souris 3xTg-AD et contrôles (**A. B. C.** CA1 : WT 6mois, n=136, WT 12 mois n=120, 3xTg-AD 6 mois n=135, 3xTg-AD 12 mois n=120; **D. E. F.** subiculum : WT 6mois, n=143, WT 12 mois n=114, 3xTg-AD 6 mois n=135, 3xTg-AD 12 mois n=120). UA = unités arbitraires. Statistiques : test du χ^2 , **p<0,01, ***p<0,001, NS=non significatif.

Superficie (Figure 37)

- Région CA1

A 6 et 12 mois, les astrocytes des souris 3xTg-AD ne possèdent pas une superficie différente de ceux des contrôles dans le CA1 (**Figure 37A,B,C**).

- Région subiculum

A 6 et 12 mois, les astrocytes des souris 3xTg-AD ont une distribution de leur superficie significativement différente de celle des contrôles (**Figure 37D,E**).

A 6 mois, la proportion d'astrocytes des souris 3xTg-AD ayant une superficie faible (superficie < 600µm²) est plus importante que celle des souris contrôles (**Figure 37F**).

Le phénomène inverse est observé à 12 mois, la proportion d'astrocytes des souris 3xTg-AD ayant une grande superficie (superficie > 1200µm²) est plus importante que celle des souris contrôles (**Figure 37F**).

Seuls les astrocytes du subiculum des souris 3xTg-AD ont une superficie différente des souris contrôles. Les astrocytes des souris 3xTg-AD de 6 mois sont globalement plus petits alors que ceux des souris 3xTg-AD de 12 mois ont une superficie plus élevée.

Dans cette analyse, seule l'influence du génotype (3xTg-AD ou contrôle) a été évaluée. Il serait intéressant d'analyser l'impact de la région sur les paramètres d'IR et de superficie (les astrocytes du subiculum semblent avoir une superficie moins importante que les astrocytes du CA1 (**Figure 37C,F**)). L'âge aussi semble avoir une influence sur l'IR des astrocytes, notamment dans le CA1 où l'IR semble augmenter avec l'âge quel que soit le génotype (**Figure 36C**).

Les souris 3xTg-AD présentent une activation des cellules microgliales et des astrocytes à 12 mois dans le subiculum, corrélée avec l'apparition des plaques A β . L'activation astrocytaire a été identifiée par l'augmentation de l'expression de la GFAP, de l'IR des astrocytes ainsi que de leur superficie. Dans cette même région, à 6 mois, les astrocytes des 3xTg-AD présentent au contraire une diminution de leur superficie par rapport aux contrôles. Dans le CA1, les astrocytes des différents groupes ne sont pas morphologiquement différents à 6 et 12 mois.

4) Caractérisation fonctionnelle des souris femelles 3xTg-AD

Les souris 3xTg-AD présentent un défaut de transmission synaptique qui a été observé par le groupe de F. LaFerla dès l'âge de 6 mois (Oddo et al., 2003b). Afin de caractériser cette fonction sur notre colonie, nous avons effectué des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de souris âgées de 7 à 7 mois et demi dans la région CA1 de l'hippocampe. Cette étude a été réalisée en collaboration avec les Dr. S. Olier, A. Panatier et J. Veran au Neurocentre Magendie de Bordeaux.

Tout d'abord, comme le groupe de F. LaFerla, nous avons mesuré la transmission glutamatergique de base. Pour ce faire nous avons enregistré des potentiels de champs post-synaptiques excitateurs (fEPSP) évoqués avec des intensités de stimulation croissantes afin de caractériser la relation entrée-sortie (Input/Output). Comme observé précédemment, la transmission synaptique glutamatergique est altérée chez les souris 3xTg-AD (**Figure 38A**). Il est donc important de noter que la transmission synaptique est modifiée avant même l'apparition de plaques séniles et/ou de DNF.

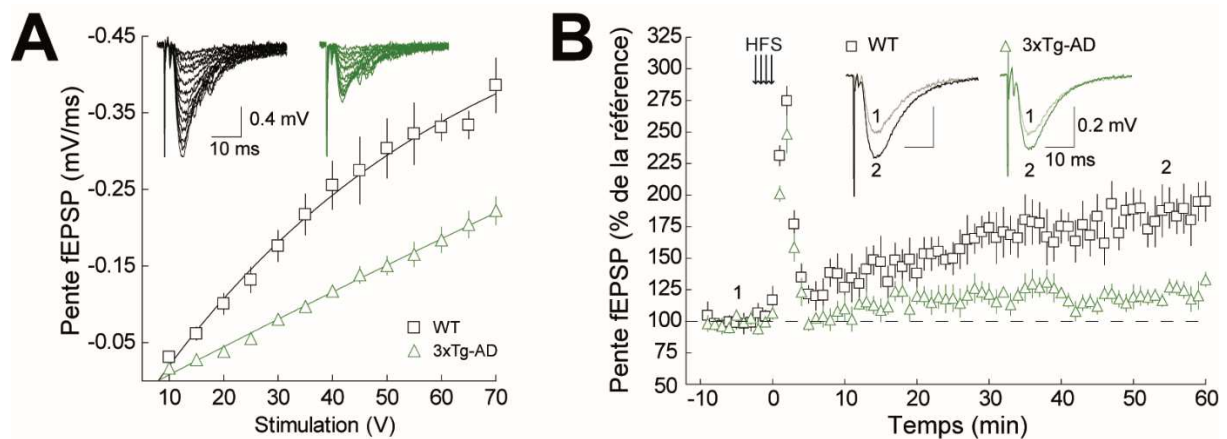


Figure 38. Les souris 3xTg-AD présentent des déficits synaptiques dans le CA1 dès 7 mois.

A. Courbes (moyenne de 3 expériences) de la pente des fEPSP en fonction de l'intensité de stimulation. Ces courbes d'Input/Output révèlent une diminution de la transmission synaptique glutamatergique de base chez les 3xTg-AD. **B.** Le graphique représente les de la pente des fEPSP avant (1) et après (2) l'induction de la LTP au cours du temps.

La potentialisation à long terme (LTP) est un mécanisme de renforcement des synapses souvent étudié dans le contexte de la MA. Elle se caractérise par une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission et donc de la pente des fEPSP. Un protocole d'induction de la LTP décrit par le groupe de F. LaFerla (Oddo et al., 2003b) a été effectué chez les souris 3xTg-AD. Alors que la LTP est bien induite chez les souris contrôles, l'efficacité de la transmission n'est pas augmentée chez les souris 3xTg-AD (**Figure 38B**).

Les souris 3xTg-AD modèle de la MA reproduisent de nombreux paramètres de cette maladie: développement des marqueurs histopathologiques (plaques séniles et DNF), réactivité gliale et déficits synaptiques. Nous avons pu observer une hétérogénéité de la population astrocytaire entre différentes régions ainsi qu'au sein d'une même région. L'apparition progressive des différents signes de la MA en fait un modèle particulièrement intéressant pour l'étude des stades précoces de développement de la MA.

B. Exploration des déficits synaptiques

L'activation des récepteurs NMDA dépend de la liaison de deux ligands : le glutamate et un co-agoniste. Alors que la glycine et la D-sérine jouent le rôle de co-agoniste, le seul ligand endogène des récepteurs synaptiques au niveau des synapses CA3-CA1 est la D-sérine (Papouin et al., 2012). Il est important de noter que la D-sérine est donc nécessaire à la mise en place de la LTP dont l'induction dépend de l'activation des récepteurs NMDA (Henneberger et al., 2010).

1) Les altérations de la LTP observées chez les 3xTg-AD sont restaurées par l'ajout de D-sérine

En collaboration avec les Dr. S. Olié, A. Panatier et J. Veran du Neurocentre Magendie de Bordeaux, une seconde étude électrophysiologique a été menée dans la région CA1 des souris 3xTg-AD afin de tester l'hypothèse selon laquelle le déficit de plasticité synaptique chez les souris 3xTg-AD serait lié à une diminution de la concentration en D-sérine à la synapse. Comme indiqué sur la **Figure 39**, l'apport exogène de D-sérine (50 μ M) a permis de restaurer la LTP chez les souris 3xTg-AD et ce, à un niveau similaire de celui induit chez les souris contrôles (**Figure 39**).

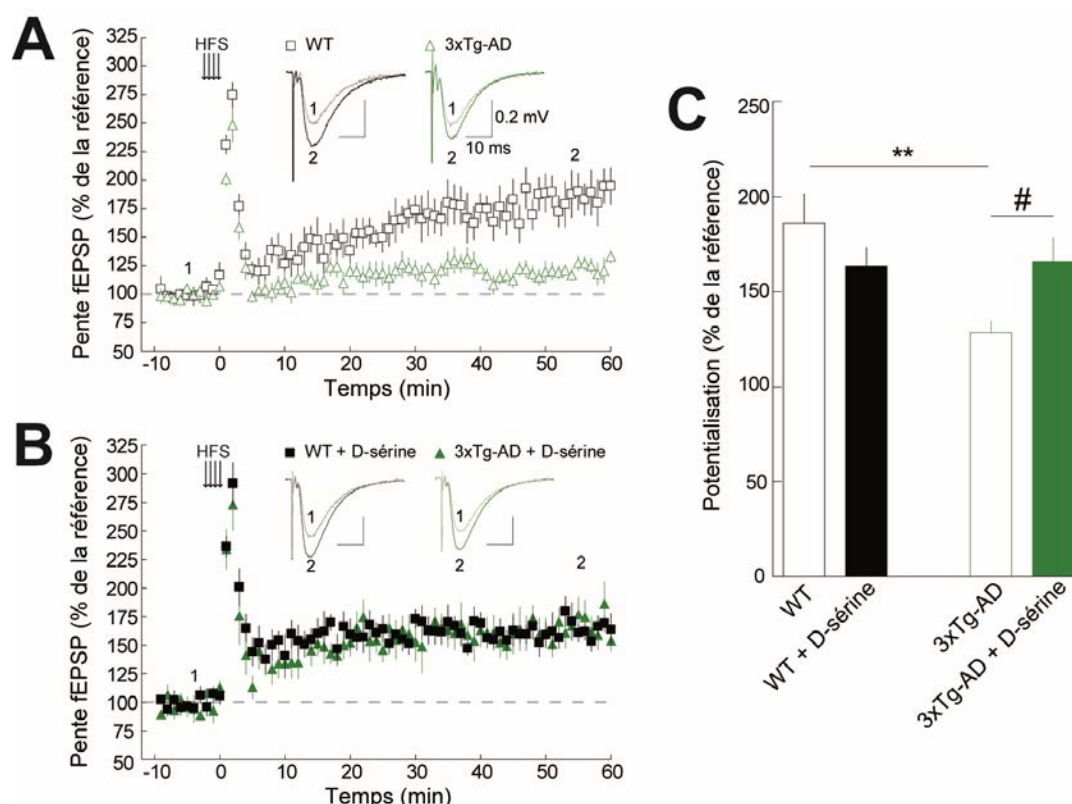


Figure 39. L'ajout de D-sérine permet de restaurer la mise en place de la LTP chez les souris 3xTg-AD dans la région CA1.

A. Le graphique représente les de la pente des fEPSP avant (1) et après (2) l'induction de la LTP au cours du temps. **B.** La même expérience d'induction de la LTP a été reproduite en présence de D-sérine (50 μ M). **C.** Les résultats sont résumés dans le graphique et sont exprimés en moyenne \pm SEM de la pente des fEPSP mesurée 60min après la stimulation (high frequency stimulation (HFS)). Statistiques: test de Mann Whitney, **p < 0,01 et test de Wilcoxon, #p < 0,05.

2) Les quantités de L-/D-sérine sont modifiées dans l'hippocampe des souris de 6 mois

Nous avons voulu évaluer si l'altération de la LTP pouvait s'expliquer par une diminution de production de la D-sérine. En collaboration avec les Dr M. Taverna et T. Tran-Maignan à l'institut Galien de Châtenay-Malabry et Pierrick Jegou (post-doctorant au laboratoire), les acides aminés L-sérine et D-sérine ont été dosés sur des hippocampes de souris âgées de 6 mois par électrophorèse capillaire. La quantité de L-sérine est diminuée chez les souris 3xTg-AD à 6 mois (**Figure 40A**). A cet âge, la quantité de D-sérine hippocampique est doublée chez les souris 3xTg-AD (**Figure 40B**). Ces différences se traduisent par une diminution significative du ratio L-/D-sérine (**Figure 40C**).

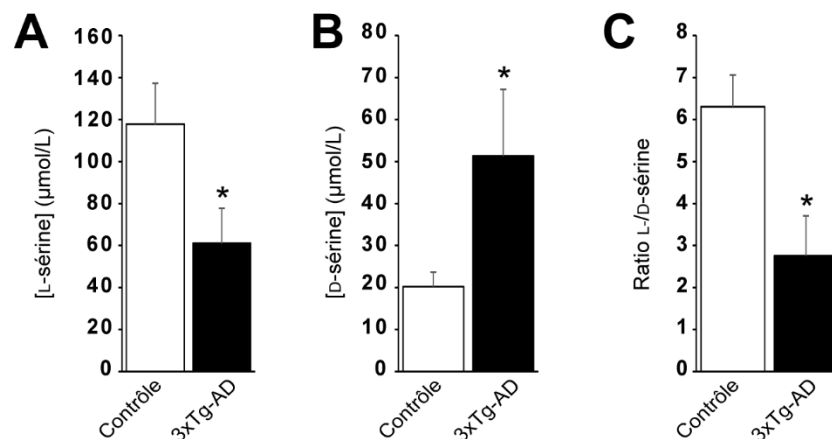


Figure 40. Dosage de la L-/D-sérine cérébrale des souris de 6 mois.

Des extraits cérébraux d'hippocampe de souris 3xTg-AD (n=7) et contrôle (n=10) âgées de 6 mois ont été analysés par électrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser (EC-LIF) afin de déterminer la concentration **A.** de la D-sérine, **B.** de la L-sérine et **C.** du ratio L-/D-sérine. Statistique : test de Student, *p<0,05.

3) L'expression de la SRR n'est pas modifiée dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD

Afin de comprendre l'origine de cette altération de production de la D-sérine, nous nous sommes intéressés à sa voie de production. Elle est formée à partir de la L-sérine par l'enzyme sérine racémase (SRR), une enzyme présente dans les neurones et les astrocytes.

Une analyse de l'expression de la SRR à 6 et 12 mois de l'hippocampe et du subiculum des souris 3xTg-AD et contrôles ne révèle pas de modification significative de l'expression de la SRR (**Figure 41**).

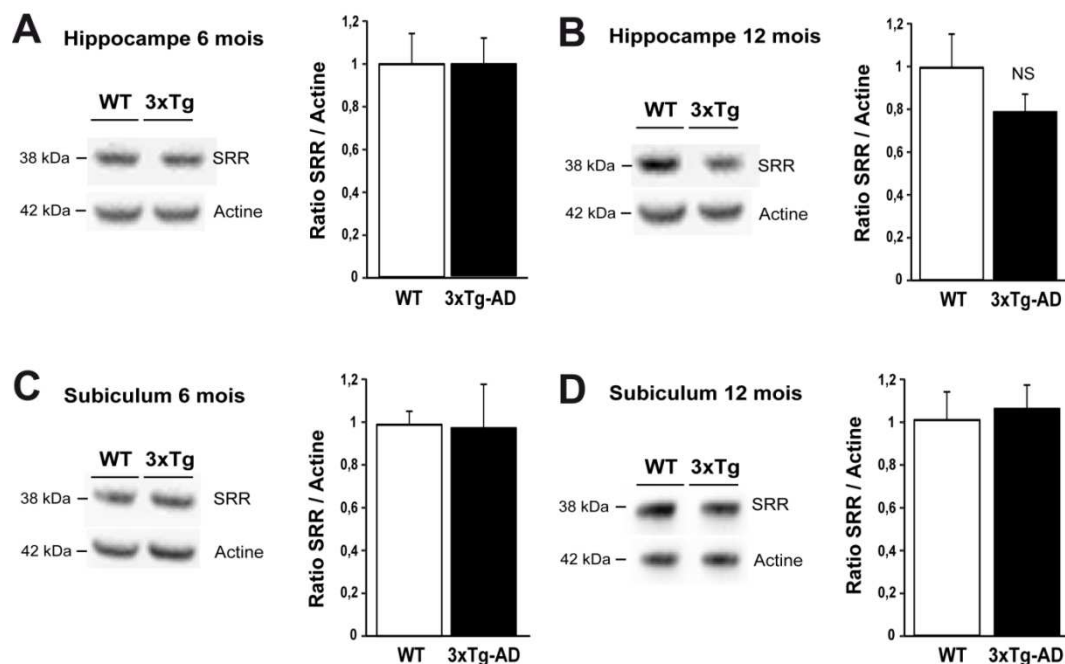


Figure 41. L'expression protéique de l'enzyme SRR n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD à 6 et 12 mois.

A. Les protéines SRR et actine ont été détectées par Western blot dans des hippocampes de souris âgées de 6 mois (WT n=6, 3xTg-AD n=7) et **B.** dans des hippocampes de souris âgées de 12 mois (WT n=6, 3xTg-AD n=6). L'actine a été utilisée comme gène de ménage pour la normalisation des résultats. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem. Statistiques : test de Student NS=non significatif.

4) L'expression globale de la PHGDH n'est pas altérée dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD

a) La 3-PHGDH est une enzyme astrocytaire

L'expression de la SRR n'étant pas modifiée dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD bien que la quantité de L- et D-sérine soit modifiée. Nous avons donc envisagé l'hypothèse que l'enzyme produisant la L-sérine puisse être altérée dans le contexte de la MA.

Or, la L-sérine est seulement produit dans les astrocytes par diversion du flux glycolytique par l'enzyme 3-phosphoglycérate-déshydrogénase (PHGDH).

L'expression de la PHGDH est majoritairement astrocytaire (**Figure 42**). Le marquage PHGDH co-localise avec le marquage GFAP mais ne co-localise pas avec le marquage NeuN (spécifique des neurones). Cependant, le marquage IBA1 des cellules microgliales co-localise au moins partiellement avec celui de PHGDH (**Figure 42**). L'étude de cette co-localisation à plus fort grossissement montre de façon distincte l'expression de PHGDH dans les cellules microgliales mais de façon moins importante que dans les astrocytes (**Figure 43**). Nous avons vérifié que l'expression de la PHGDH dans les cellules microgliales ne change pas avec leur état d'activation en observant son expression dans des cellules

microgliales de souris 3xTg-AD de 12 mois. L'expression de PHGDH ne semble pas modifiée par l'activation des cellules microgliales (**Figure 43**).

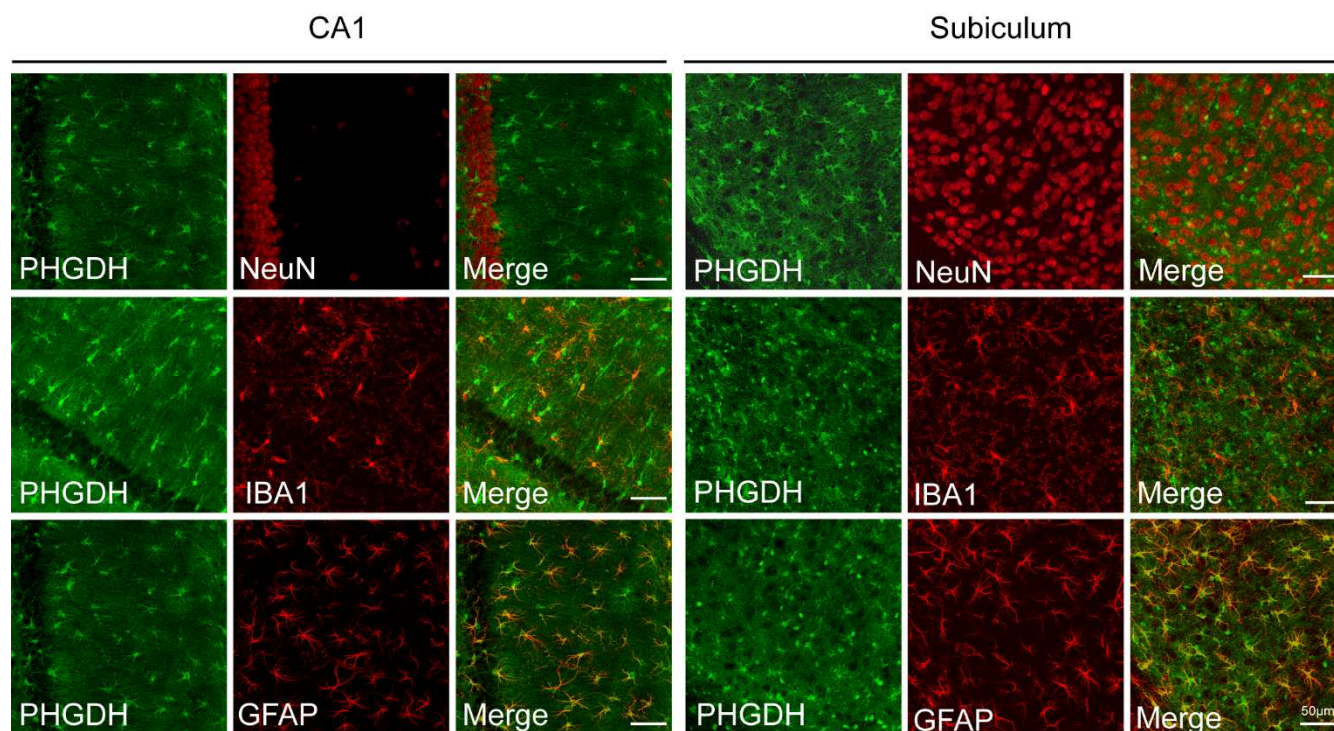


Figure 42. L'expression de l'enzyme PHGDH dans les différents types cellulaires.

L'expression des protéines PHGDH, IBA1, NeuN et GFAP a été étudiée par immuno-fluorescence sur des tissus de souris WT dans les régions CA1 et subiculum.

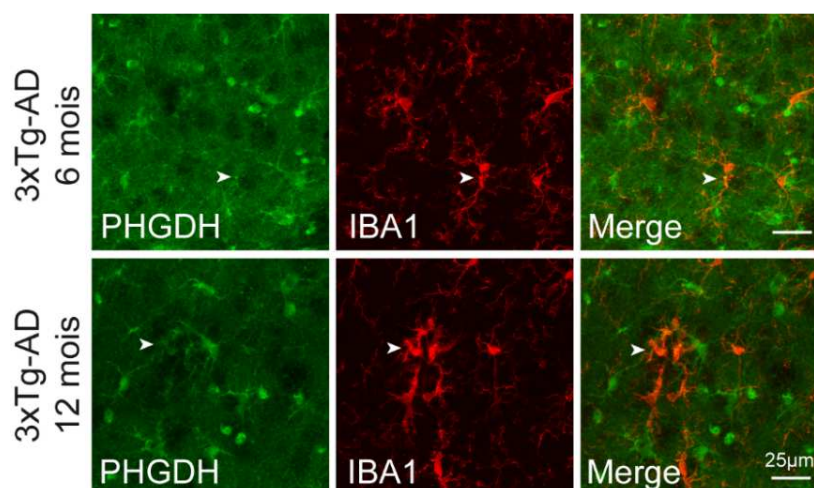


Figure 43. La PHGDH est faiblement exprimée dans les cellules microgliales.

L'expression des protéines PHGDH et IBA1 a été étudiée par immuno-fluorescence sur des tissus de souris 3xTg-AD de 6 et 12 mois.

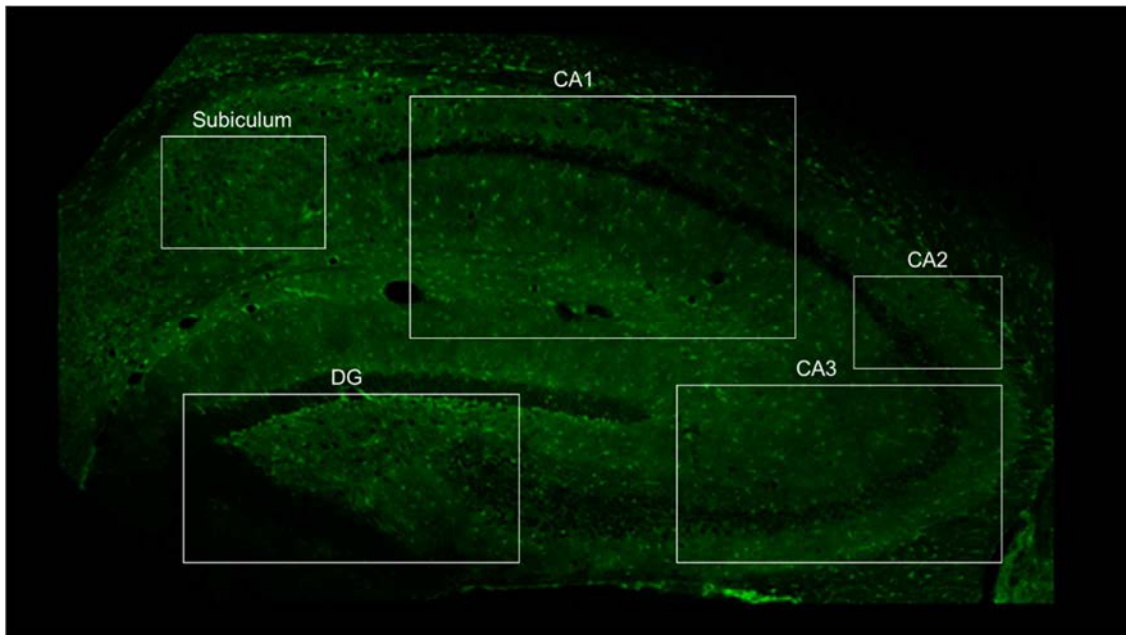


Figure 44. Expression de la PHGDH dans l'hippocampe.

L'expression de la PHGDH a été étudiée par immuno-fluorescence sur des tissus de souris WT. Abréviation : gyrus denté (DG).

Nous n'observons pas de modification majeure de l'expression de la PHGDH selon les différentes structures de l'hippocampe : subiculum, gyrus denté ou les zones CA1-CA2-CA3 (**Figure 44**).

b) L'expression du transcrit de la PHGDH n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD

Nous avons effectué une étude de l'expression de l'ARNm de la PHGDH dans l'hippocampe et le subiculum de souris 3xTg-AD âgées de 6 mois. L'hippocampe des souris 3xTg-AD présente une tendance non significative à la diminution de l'expression de la PHGDH (environ -15%) (**Figure 45A**). Aucune différence d'expression de l'ARNm de la PHGDH n'est observée dans le subiculum des souris 3xTg-AD par rapport aux contrôles (**Figure 45B**).

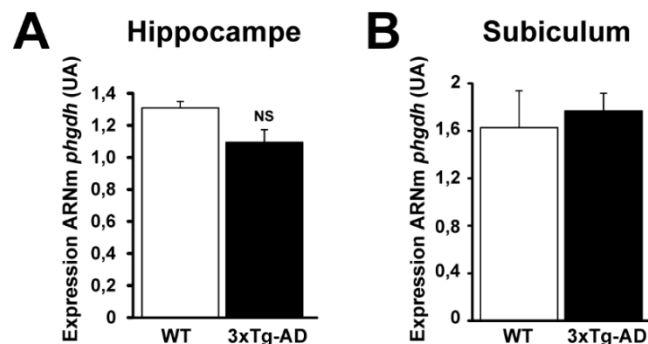


Figure 45. L'expression de l'ARNm de la PHGDH dans l'hippocampe et le subiculum.

Les niveaux d'ARNm de la *phgdh* ont été quantifiés par RT-qPCR sur l'hippocampe ou le subiculum de souris âgées de 6 mois (WT n=5, 3xTg-AD n=10) et le gène codant pour la *cyclophiline A* a été utilisé comme gène de normalisation. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM en unités arbitraires (UA). Statistiques : test de Student, NS = non significatif ($p=0,09$).

c) L'expression de la protéine PHGDH n'est pas altérée chez les souris 3xTg-AD

Bien que l'expression de l'ARNm de la PHGDH ne soit pas modifiée, nous avons quantifié l'expression de la protéine dans l'hippocampe et le subiculum de souris 3xTg-AD âgées de 6 et 12 mois. Globalement, l'expression de la protéine de la PHGDH n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD quel que soit la région ou l'âge observé même s'il y a une tendance à la diminution (**Figure 46**).

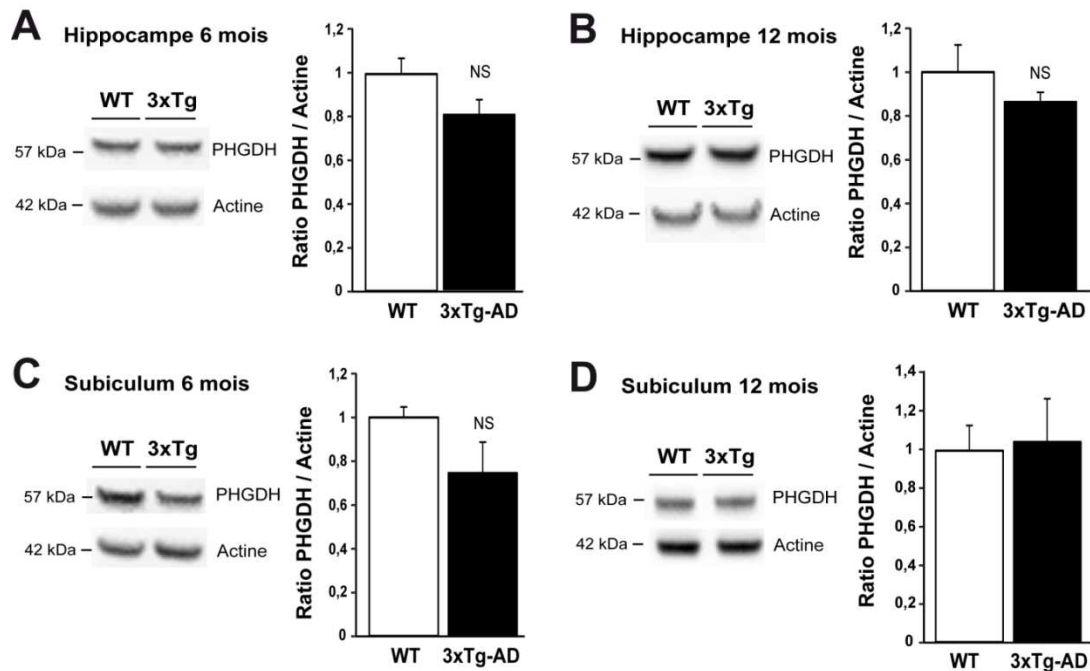


Figure 46. L'expression protéique de l'enzyme PHGDH dans l'hippocampe et le subiculum.

Les protéines PHGDH et actine ont été détectées par Western blot dans l'hippocampe et le subiculum de souris âgées de 6 mois (WT n=6, 3xTg-AD n=7) et de 12 mois (WT n=6, 3xTg-AD n=6). L'actine a été utilisée comme gène de ménage pour la normalisation des résultats. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem. Statistiques : test de Student, NS = non significatif.

Les déficits synaptiques observés dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD sont compensés par l'ajout de D-sérine. L'expression de la L- et D-sérine est altérée chez les souris 3xTg-AD âgées de 6 mois. La D-sérine, dérivant de la L-sérine, est produite par l'activité de la SRR dont l'expression n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD. La L-sérine est uniquement synthétisée dans les astrocytes via l'enzyme PHGDH. L'étude de l'expression de l'ARNm et de la protéine de la PHGDH a mis en évidence une tendance, non significative, à la diminution de l'expression de cette enzyme chez les souris 3xTg-AD. Les astrocytes étant une population cellulaire particulièrement hétérogène, nous avons pris en compte cette diversité dans la suite de l'étude.

5) L'influence de la morphologie des astrocytes sur l'expression de l'enzyme PHGDH

Comme les astrocytes des souris 3xTg-AD présentent des propriétés morphologiques hétérogènes, nous avons évalué les modifications d'expression de la PHGDH en fonction de la morphologie des astrocytes (identifiée par analyse de Sholl et quantifiée par l'index de ramification (IR) et la superficie).

a) La morphologie des astrocytes n'influence pas l'expression de la PHGDH entre les 3xTg-AD et les WT

L'expression de l'enzyme PHGDH n'est pas liée à l'indice de ramification des astrocytes (**Figure 47A**) ou à la superficie des cellules (**Figure 47B**). Cependant, lors de cette étude, nous avons remarqué que cette enzyme est différenciellement exprimée dans les astrocytes : certains l'expriment beaucoup (150 UA) alors que d'autres astrocytes l'expriment très peu (40 UA) (**Figure 47**). Nous avons donc poursuivi cette étude en étudiant la distribution de l'expression de la PHGDH au sein de la population astrocytaire dans ces deux structures.

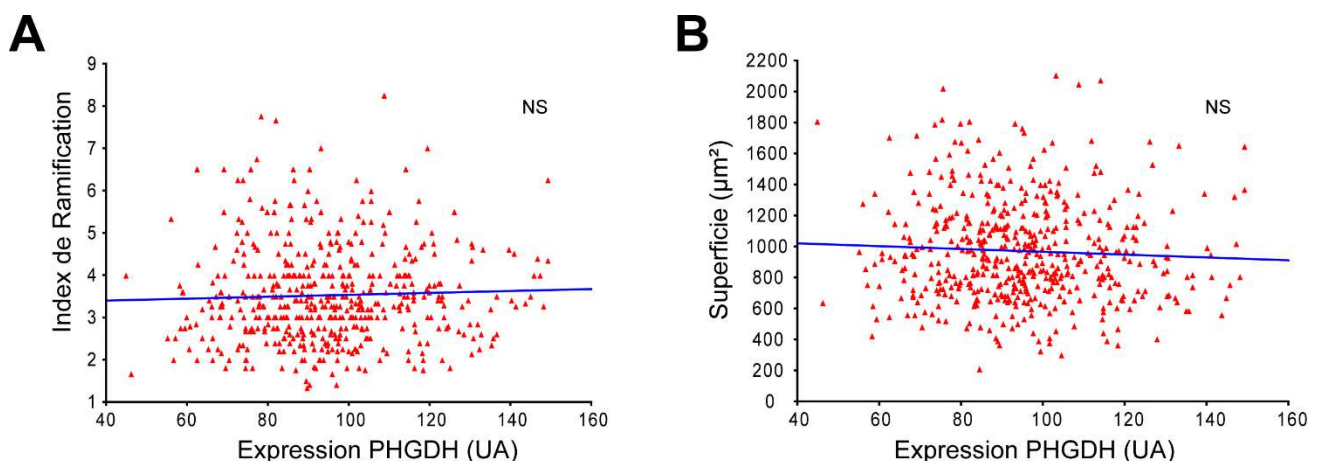


Figure 47. L'index de ramification et la superficie des astrocytes ne sont pas corrélés à leur expression de PHGDH.

A. Les index de ramification de chaque astrocyte ont été associés à leur expression de PHGDH.

B. Les superficies de chaque astrocyte ont été associées à leur expression de PHGDH. Une analyse par régression linéaire a été effectuée. UA = unités arbitraires. Test de corrélation de Pearson, NS = non significatif.

b) L'enzyme PHGDH de l'hippocampe est exprimée de manière différentielle entre les 3xTg-AD et les WT

Nous pouvons observer que la distribution de l'expression de l'enzyme PHGDH des souris 3xTg-AD dans les astrocytes de l'hippocampe à 6 mois est significativement différente de celle observée pour les souris contrôles (**Figure 48A**). Les astrocytes des souris 3xTg-AD ont une expression de l'enzyme

rarement supérieure à 120 UA alors que 15% des astrocytes des souris contrôles expriment fortement cette enzyme (**Figure 48C**).

Dans cette région de l'hippocampe, à 12 mois, les astrocytes des 3xTg-AD présentent aussi une distribution de la PHGDH significativement différente des contrôles (**Figure 48B**). Mais contrairement aux astrocytes de 6 mois, les astrocytes des souris 3xTg-AD de 12 mois ont une expression de la PHGDH plus hétérogène que les contrôles. Nous observons que 30% des astrocytes des 3xTg-AD expriment peu la PHGDH et 20% l'expriment beaucoup alors que les astrocytes WT ont une expression plus homogène de l'enzyme (**Figure 48C**).

Cette variation de diversité d'expression peut refléter une modification de fonctionnalité des astrocytes dans le processus de production *de novo* de L-sérine.

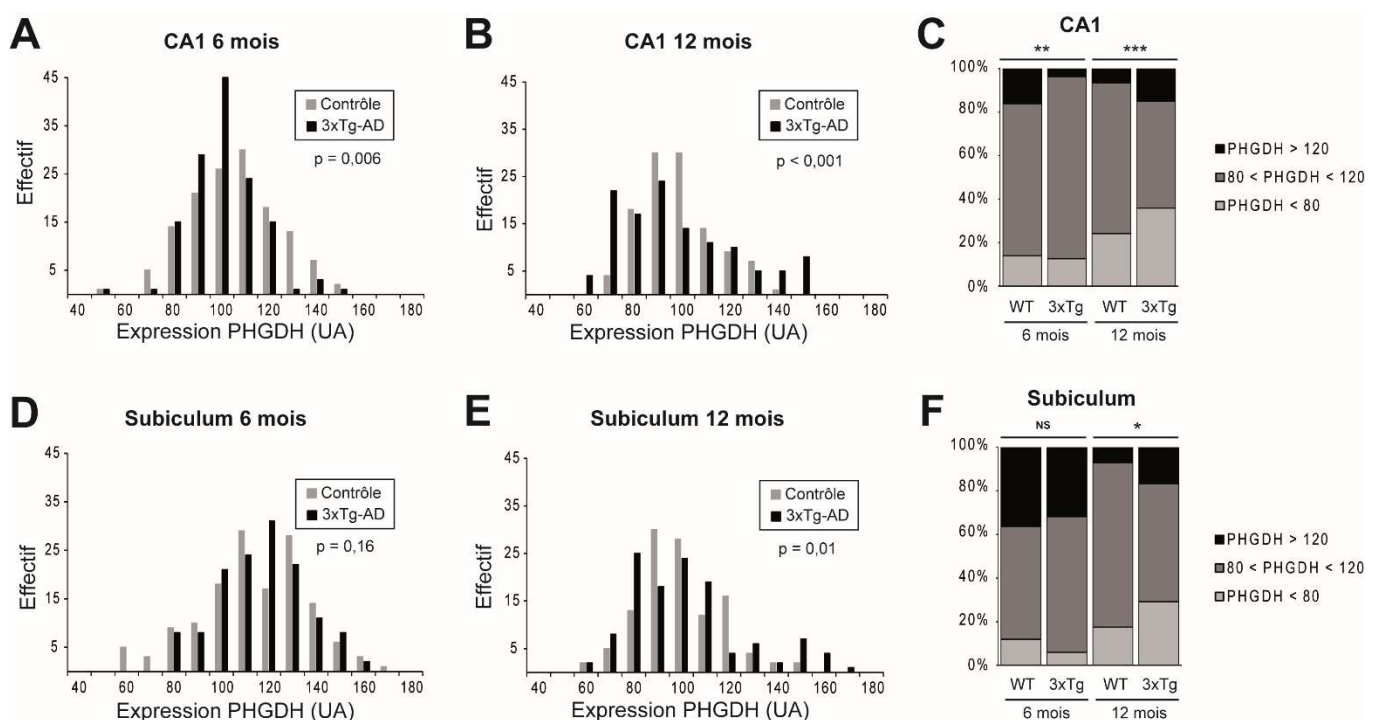


Figure 48. Distribution de l'expression de la PHGDH des astrocytes des souris 3xTg-AD.

Analyse de Sholl de tissus immuno-marqués pour révéler la GFAP et la PHGDH de souris 3xTg-AD et contrôles (**A. B. C.** CA1 : WT 6mois, n=136, WT 12 mois n=120, 3xTg-AD 6 mois n=135, 3xTg-AD 12 mois n=120; **D. E. F.** subiculum : WT 6mois, n=143, WT 12 mois n=114, 3xTg-AD 6 mois n=135, 3xTg-AD 12 mois n=120). UA = unités arbitraires. Statistiques : test du χ^2 , *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, NS = non significatif.

Dans le subiculum, à 6 mois, les souris 3xTg-AD et contrôles ont la même expression de PHGDH au sein de la population astrocytaire (**Figure 48D**). A 12 mois, dans le subiculum, nous observons que la PHGDH est exprimée de façon plus hétérogène chez les astrocytes des 3xTg-AD par rapport aux astrocytes contrôles, comme observé dans l'hippocampe (**Figure 48E,F**). La **Figure 49** permet d'illustrer cette hétérogénéité d'expression de la PHGDH au sein de la population astrocytaire, notamment dans le subiculum des souris âgées de 12 mois (**Figure 49**). Sur un subiculum contrôle et

un subiculum 3xTg-AD, quelques astrocytes ont été isolés, une analyse de Sholl effectuée et l'aire de chaque cellule reportée sur le marquage PHGDH. Les cellules #5 et #8 ont des IR proches (~6,5) mais une expression de la PHGDH très différente (64 et 138 respectivement) (**Figure 49**).

A 6 mois, les astrocytes du subiculum expriment globalement plus la PHGDH que les astrocytes de l'hippocampe soulignant l'importance de la disparité de la population astrocytaires entre les régions cérébrales.

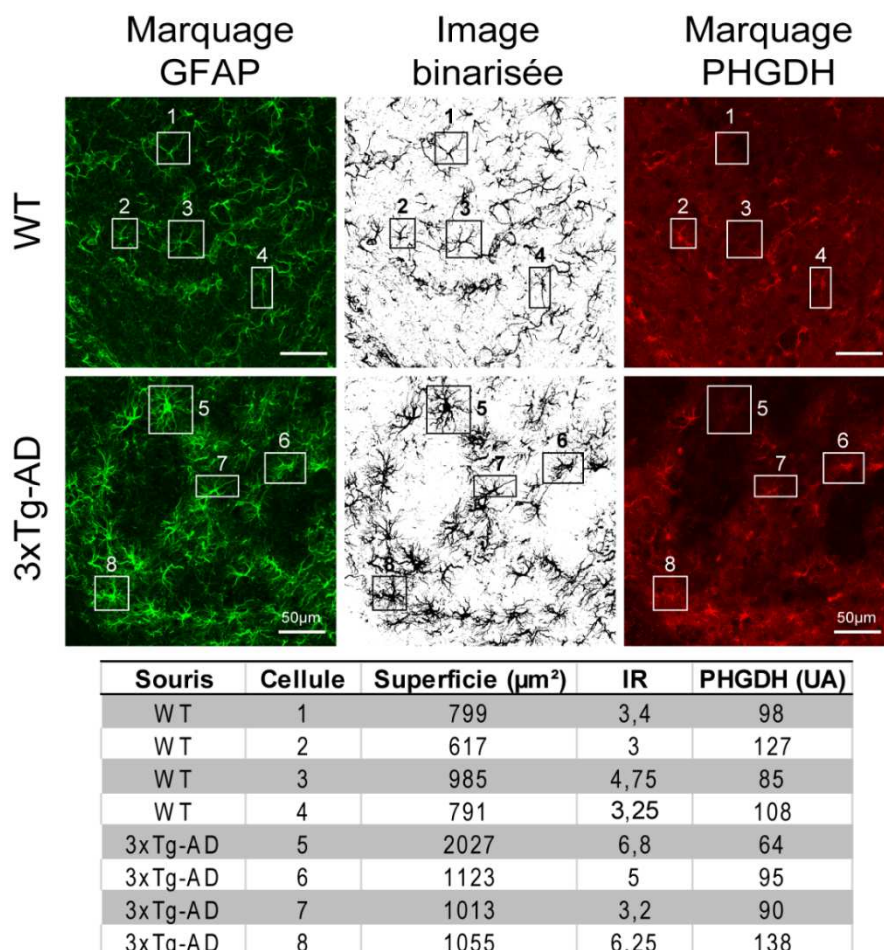


Figure 49. Illustration de la plus grande hétérogénéité d'expression de la PHGDH dans le subiculum des souris 3xTg-AD.

Des coupes de souris WT et 3xTg-AD ont été immuno-marquées pour révéler la GFAP et la PHGDH. Après binarisation, les astrocytes ont été manuellement isolés et une analyse de Sholl a été faite permettant d'obtenir la superficie et l'indice de ramification (IR) de chaque cellule. La ROI correspondant à chaque astrocyte est reportée sur le marquage PHGDH afin de déterminer son niveau d'expression en unités arbitraires (UA).

Cette analyse cellule par cellule a permis de montrer que l'enzyme PHGDH, indispensable à la synthèse *de novo* de L-sérine, a une distribution d'expression modifiée chez les souris transgéniques dans l'hippocampe (à 6 et 12 mois) et dans le subiculum (à 12 mois). Ce changement d'expression souligne la diversité de la population astrocytaire et soulève la question de l'implication de cette variation d'expression d'une protéine dans une région donnée.

Les enzymes impliquées dans la synthèse de la L-/D-sérine ne sont pas fortement modifiées chez les 3xTg-AD. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une altération du transport de la L-/D-sérine par les astrocytes.

6) Etude de l'expression d'un transporteur de la L-/D-sérine dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD

Les acides aminés neutres tels que la L-/D-sérine ont préférentiellement transportés via les transporteurs Asc-1 et ASCT. La localisation du transporteur ASCT1 est débattue au sein de la communauté scientifique : souvent localisé dans les neurones (Yamamoto et al., 2004), une étude a aussi montré sa localisation préférentielle dans les astrocytes (Sakai et al., 2003). Nous avons étudié l'expression et la localisation de ce transporteur chez les souris WT et transgéniques.

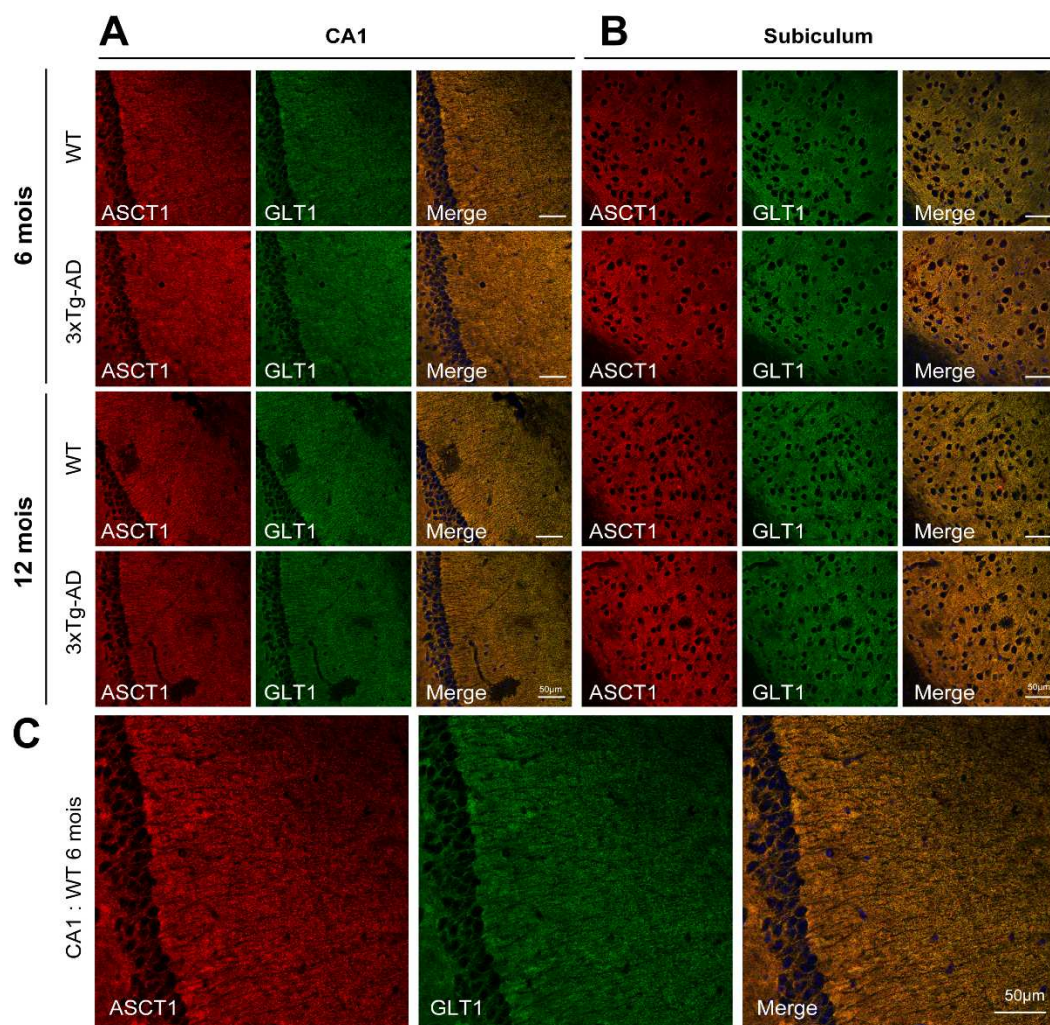


Figure 50. L'expression du transporteur astrocytaire de la L-/D-sérine ASCT1 n'est pas modifiée chez les souris 3xTg-AD.
Des tissus de souris WT et 3xTg-AD âgées de 6 et 12 mois ont été immuno-marqués pour révéler les protéines ASCT1 et GLT1.

L'expression membranaire des transporteurs rend souvent difficile la détermination du type cellulaire dans lequel ils sont exprimés. C'est pourquoi nous avons effectué un double marquage GLT1, connu pour être membranaire et astrocytaire, et ASCT1. Les images superposées des deux marquages montrent une parfaite co-localisation entre l'expression de GLT1 et d'ASCT1 démontrant une localisation astrocytaire du transporteur ASCT1 (**Figure 50**). Nous pouvons observer une absence de marquage des neurones qui apparaissent noirs et dont les prolongements sont aussi visibles en noir (**Figure 50C**). Ce type de marquage est difficilement quantifiable en immuno-histologie, cependant, nous n'observons pas de différence majeure d'expression d'ASCT1 entre les différentes régions ni entre les différents groupes de souris (**Figure 50**).

L'expression des enzymes nécessaires à la synthèse et au transport de la L-/D-sérine, PHGDH, SRR et ASCT1, n'est pas significativement altérée chez les souris 3xTg-AD. Une modification locale de l'expression de la PHGDH dans les astrocytes des souris 3xTg-AD est observée mais n'entraîne pas de modification de son expression globale dans le subiculum ou l'hippocampe.

La PHGDH détourne une partie du flux glycolytique afin d'alimenter la voie de production de la L-sérine. Une altération du flux glycolytique pourrait conduire à une modification de la synthèse de L-/D-sérine. C'est pourquoi nous avons étudié le métabolisme cérébral des souris 3xTg-AD pour évaluer les changements métaboliques de ces souris.

C. Altérations métaboliques précoces des souris 3xTg-AD par étude *in vivo* du métabolisme cérébral

1) Etude des paramètres physiologiques des 3xTg-AD: poids et glycémie

Nous avons mené une étude *in vivo* du métabolisme cérébral des souris 3xTg-AD âgées de 6 et 12 mois. Nous avons tout d'abord mesuré le poids et la glycémie de ces souris après 16h de jeûne. La glycémie des souris 3xTg-AD est significativement plus faible que les souris contrôles du même âge (**Figure 51A, Figure 52A**). Ce résultat est en accord avec certains travaux (Masciopinto et al., 2012) montrant une glycémie plus faible des souris femelles 3xTg-AD mais en désaccord avec les résultats de l'équipe de F. Calon (Phivilay et al., 2009). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par les différentes méthodes utilisées pour déterminer la glycémie et le fait que l'équipe de F. Calon n'ait pas séparé les mâles des femelles dans ses groupes expérimentaux. Les souris contrôles ont un poids équivalent aux souris 3xTg-AD du même âge (**Figure 51B, Figure 52B**)

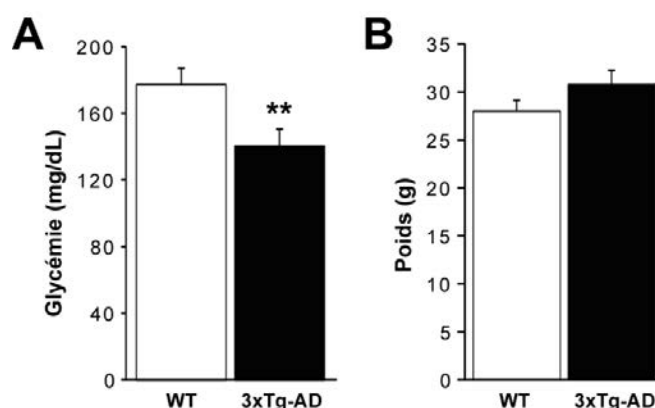


Figure 51. Les souris 3xTg-AD âgées de 6 mois ont une glycémie inférieure à celle des contrôles mais un poids équivalent.

A. La glycémie et **B.** le poids des souris WT (n=10) et 3xTg-AD (n=10) ont été mesurés 12h après la mise à jeun. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- sem. Statistiques : test de Student, **p<0,01

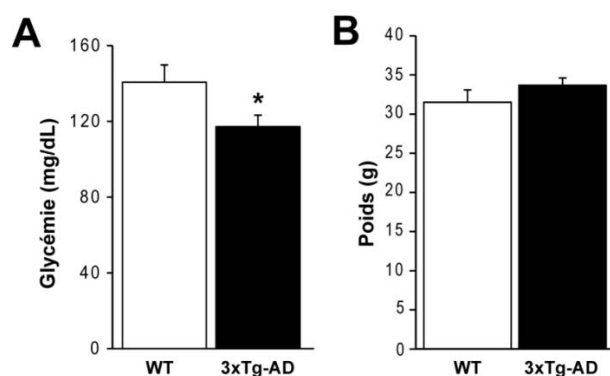


Figure 52. Les souris 3xTg-AD âgées de 12 mois ont une glycémie inférieure à celle des contrôles.

A. La glycémie et **B.** le poids des souris WT (n=9) et 3xTg-AD (n=10) ont été mesurés 12h après la mise à jeun. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- sem. Statistiques : test de Student, *p<0,05

2) Etude du métabolisme cérébral des souris 3xTg-AD par autoradiographie

Le métabolisme cérébral des souris 3xTg-AD a été étudié grâce à la technique de l'autoradiographie du [^{14}C]-2 désoxyglucose (2DG). L'activité radioactive a été analysée par la méthode "statistical parametric mapping" (SPM) permettant de comparer voxel à voxel les activités des souris contrôles et 3xTg-AD sans *a priori* régional sur des volumes autoradiographiques reconstruits en 3D (Dubois et al., 2010, Lebenberg et al., 2011). L'analyse SPM permet la détection de changements de métabolisme très locaux. Cette étude a été réalisée en collaboration avec les Dr T. Delzescaux et A.-S. Hérard ainsi que les étudiants en thèse M. Vandenberghe et Y. Balbastre du CEA-I 2 BM-MIRCen. Nous avons choisi de garder les différences significatives ayant une p-valeur inférieure à 0,01 sur des clusters ayant une taille supérieure à 0,025mm³.

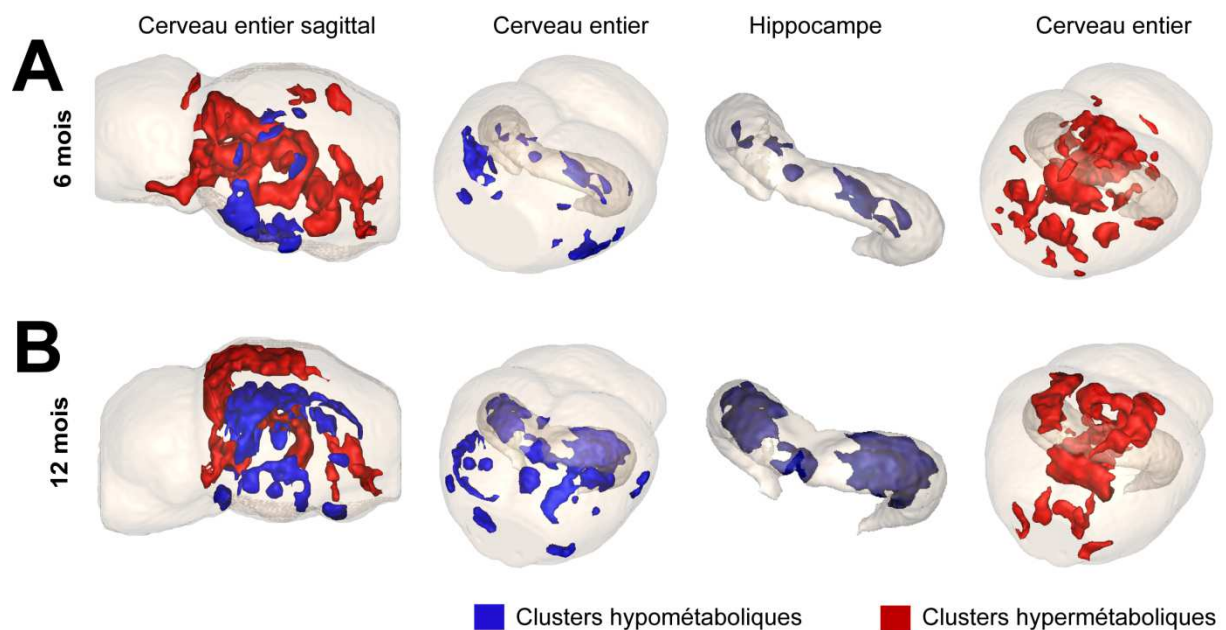


Figure 53. Altération de la consommation de glucose chez les souris 3xTg-AD par rapport aux contrôles.

A. Etude autoradiographique à 6 mois de la consommation de glucose des souris 3xTg-AD (WT n=10, 3xTg-AD n=10). **B.** Etude autoradiographique à 12 mois de la consommation de glucose des souris 3xTg-AD (WT n=9, 3xTg-AD n=10). Cette figure représente les zones statistiquement différentes des souris 3xTg-AD par rapport aux souris contrôles. Statistiques : test de Student, $p < 0,05$

Une première analyse a été faite sur le cerveau entier montrant des différences de métabolisme chez les souris 3xTg-AD dès l'âge de 6 mois (**Figure 53**). Les souris 3xTg-AD présentent de nombreuses zones hypermétaboliques comme le striatum, le cortex auditif et rétrospécial. A cet âge, des zones hypométaboliques sont aussi observées : l'amygdale, le cortex entorhinal et l'hippocampe. Des structures comme le thalamus ou le cortex piriforme présentent des zones hypermétaboliques et des zones hypométaboliques. Les souris 3xTg-AD âgées de 12 mois possèdent moins de clusters

hypermétaboliques mais plus de clusters hypométaboliques (**Figure 53**). Les régions du thalamus, du cortex visuel et des colliculi supérieurs consomment plus de glucose chez les souris 3xTg-AD que chez les souris contrôles. A l'inverse, les régions hypométaboliques sont le striatum, l'amygdale, le cortex piriforme et entorhinal ainsi que l'hippocampe (pour un tableau résumé, voir **annexe B.**).

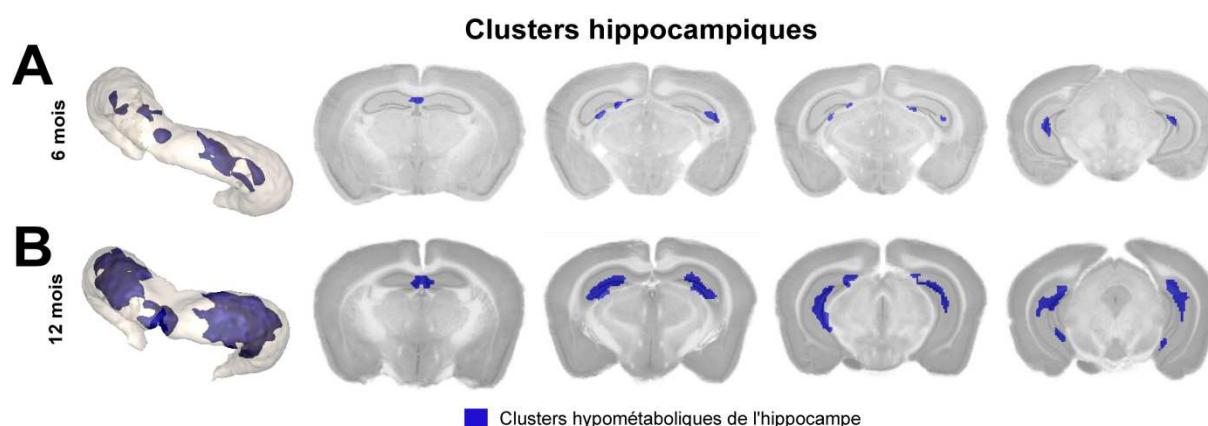


Figure 54. Diminution de la consommation de glucose dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD. Cette figure représente les zones identifiées dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD comme étant hypométaboliques **A.** à 6 mois et **B.** à 12 mois. Statistiques : test de Student, $p < 0,05$

Une seconde analyse faite seulement sur l'hippocampe, notre principale région d'étude lors de ce projet, a permis d'identifier plus finement la localisation des clusters et leur altération métabolique. Nous avons pu ainsi observer que les souris 3xTg-AD ne présentent pas d'hypermétabolisme dans la région hippocampique mais seulement un hypométabolisme (**Figure 54**).

Région	WT Activité normalisée \pm SEM (nCi/g)	3xTg-AD Activité normalisée \pm SEM (nCi/g)	Pourcentage de différence	Test de Student (p- valeur)
CA1-CA3-DG (gauche)	174 \pm 4	152 \pm 3	-12,6	3,2E-04
CA1-DG (droit)	178 \pm 3	161 \pm 3	-9,6	1,5E-03
CA2-CA3 (gauche)	205 \pm 2	186 \pm 2	-9,3	1,4E-05
CA1-DG (gauche)	176 \pm 5	154 \pm 3	-12,5	9,7E-04
CA3-DG (droit)	204 \pm 6	172 \pm 3	-15,7	2,0E-04
CA2 (central)	167 \pm 2	149 \pm 3	-10,8	1,7E-04

Figure 55. Les clusters hypométaboliques de l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées de 6 mois. Six clusters situés dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées de 6 mois consomment moins de glucose que les souris contrôles. Statistiques : test de Student, $p < 0,05$. Abréviation : gyrus denté (DG).

Les clusters hypométaboliques des souris 3xTg-AD de 6 mois sont situés dans une partie CA2, des zones du gyrus denté/CA3 et une partie du CA1 (**Figure 54, Figure 55**). Les clusters identifiés présentent une diminution d'activité par rapport aux contrôles comprise entre 9 et 16% (**Figure 55**). L'ensemble des clusters hypométaboliques touchent 3% du volume de l'hippocampe.

A 12 mois, les clusters hypométaboliques sont localisés dans les mêmes zones que les clusters identifiés à 6 mois mais concernent plus de 18% de la structure hippocampique (**Figure 54**). Les clusters sont plus étendus, suggérant une aggravation des altérations métaboliques avec l'âge et donc avec l'aggravement de la pathologie MA. Les diminutions d'activité observées à 12 mois sont d'environ 12% pour les clusters hippocampiques droit et gauche (**Figure 56**).

Région	WT Activité normalisée ±SEM (nCi/g)	3xTg-AD Activité normalisée ±SEM (nCi/g)	Pourcentage de différence	Test de Student (p- valeur)
Hippocampe (gauche)	197 ±2	174 ±2	-11,7	1,0E-06
Hippocampe (droit)	199 ±2	176 ±2	-11,6	8,7E-07

Figure 56. Les clusters hypométaboliques de l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées de 12 mois.

Deux clusters situés dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées de 12 mois consomment moins de glucose que les souris contrôles. Statistiques : test de Student, $p < 0,05$.

Cette étude a montré que les souris 3xTg-AD présentent des altérations métaboliques dès l'âge de 6 mois et que ces altérations s'intensifient avec l'âge. De façon intéressante, l'hippocampe est l'une des régions précocement touchées par les modifications métaboliques et c'est aussi la région présentant un déficit synaptique. Nous pouvons faire l'hypothèse que la diminution du flux glycolytique dans cette région entraîne une diminution de production de 3-phosphoglycérate, le substrat de la PHGDH, entraînant une altération de production de L-sérine et par conséquent de D-sérine. Cependant, l'étude du métabolisme par autoradiographie ne permet pas de discriminer le type cellulaire touché par ces altérations métaboliques. De nouveaux outils, notamment les sondes FRET, permettent l'étude du flux de différents métabolites à la résolution cellulaire.

D. Etude du métabolisme cérébral à l'échelle cellulaire par utilisation de sondes FRET

1) Développement de vecteurs viraux s'exprimant dans des types cellulaires spécifiques

Des études préliminaires menées par Emilie Faivre (post-doctorant au laboratoire) d'injection de lentivirus codant pour des sondes FRET, ont montré une faible expression des transgènes dans les cellules ciblées. Cette expression des sondes n'était pas suffisante pour permettre des expériences de FRET. Les vecteurs AAVs sont de petites particules virales permettant l'infection de larges régions du cerveau et sont peu immunogéniques (Sun et al., 2003). Nous avons donc développé des AAVs permettant l'expression de transgène dans des types cellulaires spécifiques (neurones et astrocytes).

a) Ciblage cellulaire spécifique des AAVs

Afin de cibler les neurones, nous avons utilisé le sérotype de l'AAV-2/10 en combinaison avec le promoteur PGK. Ce vecteur viral est spécifique des neurones, cela est illustré par la co-localisation du transgène codant pour la td-Tomato et du marquage neuronal NeuN (**Figure 57A**).

Pour cibler les astrocytes, nous avons testé différentes combinaisons de sérotypes (AAV-2/5 ou AAV-2/9) associés à un promoteur (GS ou GFA-ABC1D). C'est la combinaison AAV-2/9-GFA-ABC1D qui permet de cibler les astrocytes avec le plus de spécificité tout en permettant une forte expression du transgène. La co-localisation de la td-Tomato et de la GFAP atteste de cette spécificité d'infection et d'expression du vecteur viral (**Figure 57B**).

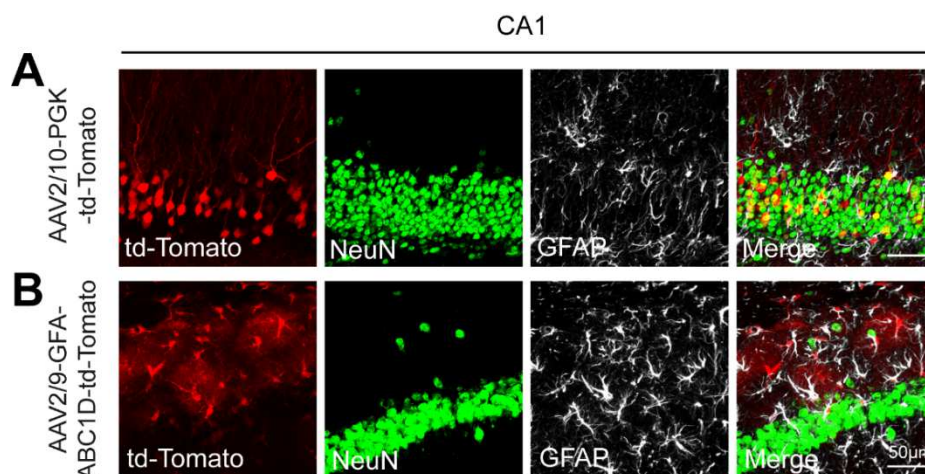


Figure 57. Les vecteurs viraux développés ciblent spécifiquement les astrocytes ou les neurones.

Trois semaines après injection de souris avec les vecteurs viraux codant pour la td-Tomato dans le CA1 ($5 \cdot 10^9$ vg/ μ l), des marquages immuno-fluorescents ont été réalisés sur des coupes de tissus pour révéler la GFAP et NeuN, des marqueurs respectivement astrocytaire et neuronal. **A.** L'AAV-2/10 combiné au promoteur PGK permet l'expression spécifique du transgène dans les neurones. **B.** Les astrocytes expriment spécifiquement le transgène des vecteurs viraux de sérotype AAV-2/9 et codant pour le promoteur GFA-ABC1D.

b) Les vecteurs viraux ne provoquent pas de réaction inflammatoire du cerveau

L'injection de virus dans le cerveau de souris pourrait entraîner une activation cellulaire non voulue et perturber l'homéostasie cérébrale. Afin d'analyser ces paramètres d'activation dans les zones d'injection des AAVs, nous avons effectué des marquages des protéines IBA1 et Vimentine, dont l'expression est augmentée respectivement en cas d'activation des cellules microgliales et astrocytaires.

L'expression des transgènes des AAVs dans les neurones ou les astrocytes de l'hippocampe n'entraîne pas de réactivité cellulaire, contrairement au contrôle positif où l'augmentation d'expression d'IBA1 et de la Vimentine est flagrante (**Figure 58**).

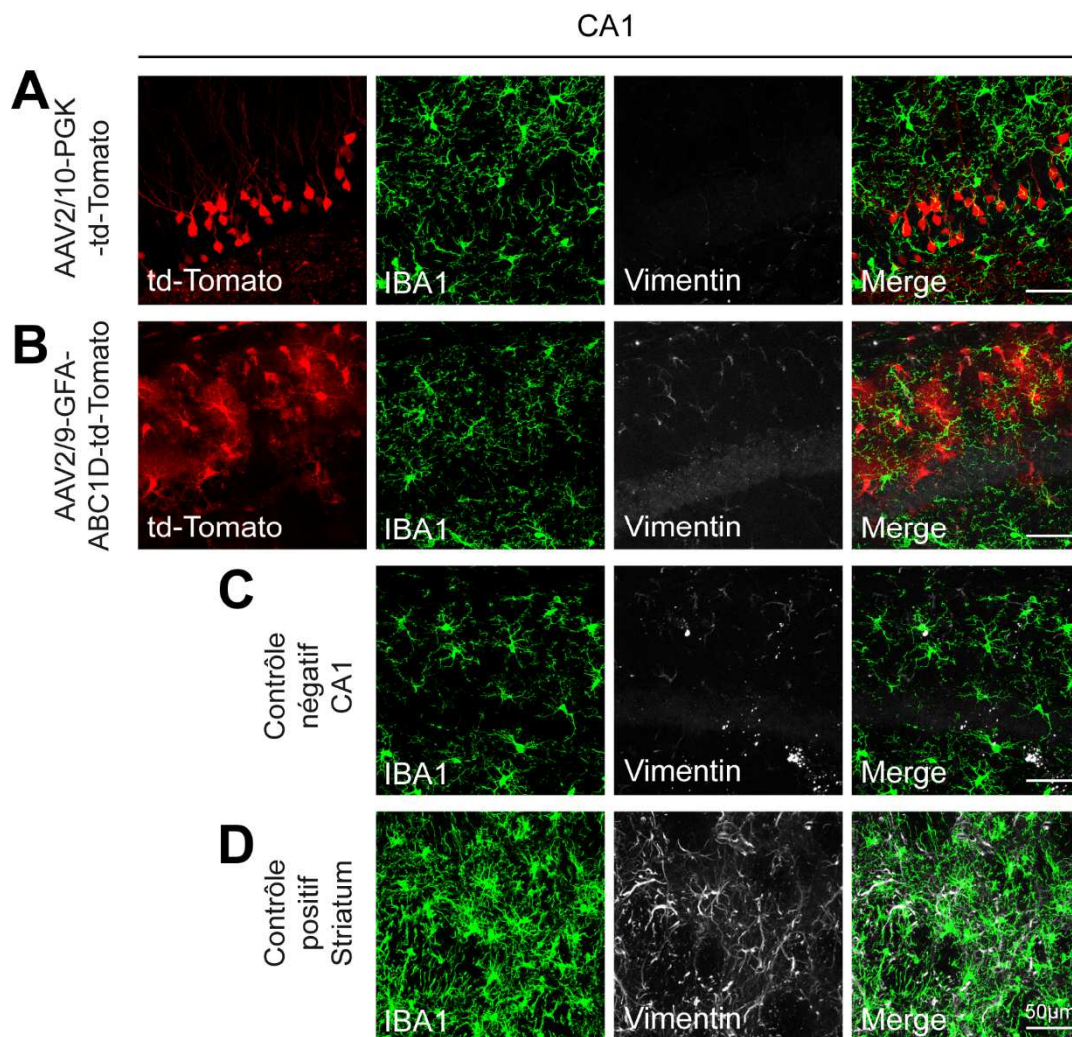


Figure 58. L'injection et l'expression des vecteurs viraux développés ne provoquent pas d'activation des tissus.

A.B. Trois semaines après injection de souris avec les vecteurs viraux codant pour la td-Tomato dans le CA1 (5.10^9 vg/ μ l), des marquages immuno-fluorescents ont été réalisés sur des coupes de tissus pour révéler IBA1 et Vimentin, des marqueurs de l'activation microgliale et astrocytaire. **C.** Une coupe de souris non injectée par des virus a servi de contrôle négatif et **D.** une coupe présentant une lésion du striatum par le quinolinate a servi de contrôle positif d'activation des cellules microgliales et des astrocytes. Les AAV-2/10-PGK et AAV-2/9-GFA-ABC1D exprimant la td-Tomato ne provoquent pas d'activation des cellules microgliales ou des astrocytes.

2) Expression des sondes FRET dans différents types cellulaires

Afin de vérifier que l'expression des AAVs permet une expression suffisante des sondes FRET pour réaliser des enregistrements, nous avons injecté les AAVs codant pour une sonde FRET dans le cortex de souris. L'AAV ciblant les neurones s'exprime fortement (**Figure 59A**) alors que l'AAV ayant un tropisme astrocytaire s'exprime très faiblement et ne permet pas d'envisager d'enregistrer un signal FRET (**Figure 59B**). L'étude de la littérature (Haddad-Mashadrizheh et al., 2009) et l'échange avec nos collaborateurs à Zurich (B. Weber, J. Stobart), nous a indiqué que l'expression du transgène dans les astrocytes pouvait être augmentée grâce à l'ajout d'un élément de régulation : un intron de la β -globine. Effectivement, l'ajout de cet élément de régulation augmente significativement l'expression de la sonde FRET (**Figure 59C**).

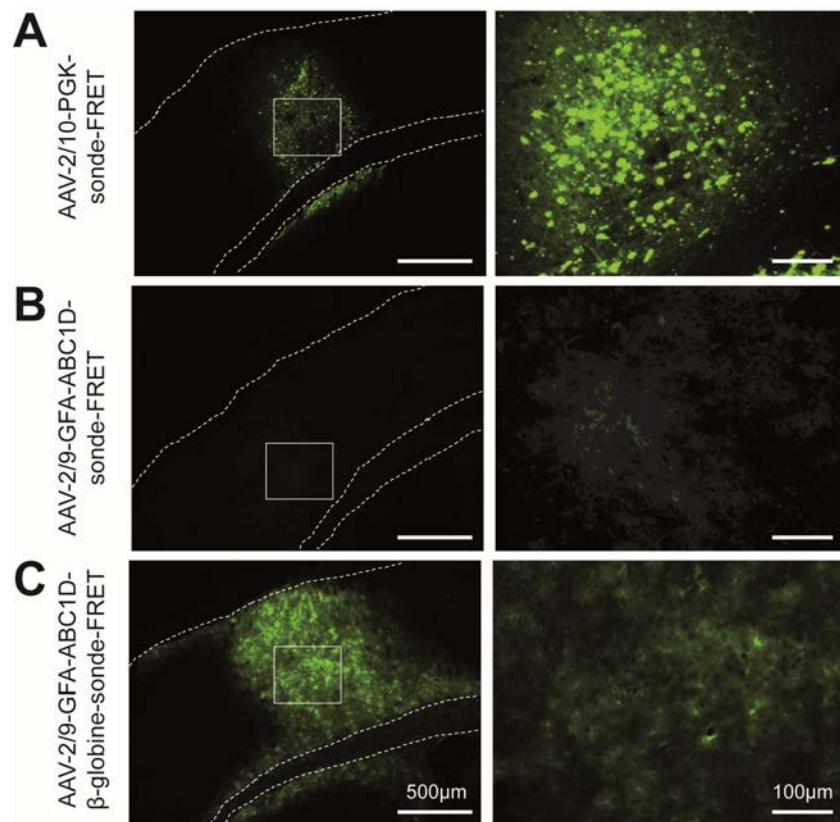


Figure 59. Expression des sondes FRET in vivo.

Injection stéréotaxique des AAVs codant pour une sonde FRET sous le contrôle **A.** du promoteur PGK, **B.** du promoteur GFA-ABC1D ou **C.** du promoteur GFA-ABC1D et de l'intron de la β -globine.

3) Enregistrements FRET : résultats préliminaires

Cette étude a été réalisée en collaboration avec les Dr. B. Cauli et X. Toussay à l'Institut de Biologie Paris-Seine. Des enregistrements de la sonde FRET sensible au glucose ont été effectués sur tranches lors d'un protocole de suppression du glucose extracellulaire. Une diminution du ratio de fluorescence est observée lors de la déplétion en glucose dans l'espace extracellulaire, témoignant de la diminution concomitante du glucose astrocytaire intracellulaire (**Figure 60**). Aucune différence n'est observée concernant l'utilisation du glucose astrocytaire entre les souris 3xTg-AD et WT (**Figure 60**).

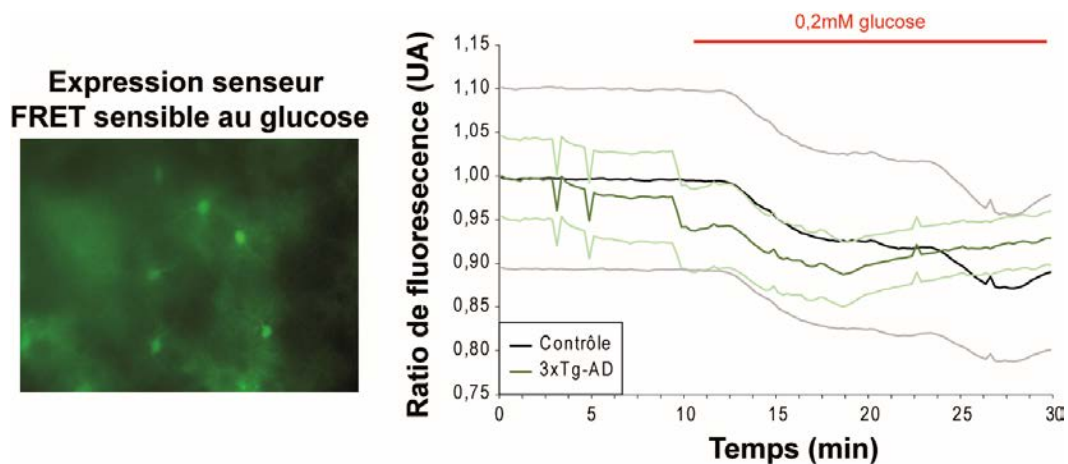


Figure 60. Enregistrement de la sonde FRET sensible au glucose dans des tranches de souris. Des souris WT et 3xTg-AD (n=3 par groupe) âgées de 6 mois ont été injectées avec un AAV favorisant l'expression d'une sonde FRET sensible au glucose dans les astrocytes. Un protocole de privation de glucose extracellulaire a été appliqué pendant l'enregistrement du signal FRET. Unité Arbitraire (UA). Statistique : test U non paramétrique de Mann-Whitney, non significatif.

Des vecteurs viraux AAVs permettant l'expression spécifique de transgènes dans les neurones ou les astrocytes ont été développés. Leur spécificité de tropisme et l'absence de réaction inflammatoire ont été évaluées et validées par une étude immuno-histologique. Ces vecteurs nous ont permis de faire exprimer des sondes FRET sensibles à différents métabolites *in vivo*. Des études de mesures du signal FRET préliminaires ont été réalisées.

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

A. Le modèle de souris 3xTg-AD

1) Caractérisation des pathologies amyloïde et tau des souris 3xTg-AD

Les souris 3xTg-AD développées par l'équipe de F. LaFerla expriment les gènes PS1^{M146V}, APP^{Swe} et tau^{P301L} (Oddo et al., 2003b). Nous avons confirmé que ces souris développent les principaux marqueurs de la MA : des plaques amyloïdes et des DNF. Nous avons confirmé que la pathologie amyloïde précède la pathologie tau (Oddo et al., 2003a), mais contrairement au modèle original, nous avons observé qu'elle se développe tout d'abord dans la formation hippocampique et pas dans le cortex. Mastrangelo & Bowers ont réalisé une étude histologique très complète sur des souris 3xTg-AD mâles âgées de 2 à 26 mois. Ils ont observé le développement des pathologies amyloïde et tau dans différentes régions (cortex entorhinal, hippocampe, amygdale et cortex moteur primaire) (Mastrangelo and Bowers, 2008). Comme nous, ils observent la présence d'A β dans la région CA1 de l'hippocampe et le subiculum dès l'âge de 6 mois. En revanche, la pathologie tau semble se développer plus tôt dans ces régions que dans les souris de notre colonie. A 6 mois, la présence de tau hyperphosphorylée n'est détectable que dans le subiculum et de façon très faible. Cependant leur étude porte sur les mâles seulement alors que nous avons focalisé notre travail sur l'étude des femelles. En effet, en comparant l'expression de l'amyloïde- β chez les souris 3xTg-AD entre les mâles et les femelles, nous avons observé une pathologie amyloïde beaucoup plus prononcée chez les femelles. Cette influence du sexe sur le développement de la MA n'a pas été décrite par l'équipe de F. LaFerla dans le papier original mais la plupart des publications suivantes ont tenu compte de ce paramètre lors de leurs expériences.

De nombreuses équipes ont montré l'importance du sexe sur le développement de la pathologie amyloïde dans ce modèle (Nelson et al., 2007, Hirata-Fukae et al., 2008). Les souris femelles modèle de la MA vivent en général plus longtemps que les mâles (Rae and Brown, 2015). L'impact des hormones stéroïdes sexuelles a été étudié chez les souris 3xTg-AD. Sur une colonie de souris 3xTg-AD dont les femelles présentaient une pathologie amyloïde plus prononcée que les mâles, différents traitements ont été donnés aux femelles et aux mâles à leur naissance (testostérone ou antagoniste des récepteurs aux androgènes respectivement). La testostérone réduit l'accumulation d'A β chez les femelles alors que l'inhibition de l'action de la testostérone chez les mâles induit une augmentation de l'accumulation d'A β (Carroll et al., 2010). Afin de tester l'impact de la progestérone et des œstrogènes, des souris 3xTg-AD femelles ont subi une ovariectomie à l'âge de 3 mois suivie d'un traitement avec l'une ou la combinaison des deux types d'hormones. Les œstrogènes diminuent la pathologie amyloïde alors que la progestérone diminue la phosphorylation de la protéine tau. Administrées en combinaison, la progestérone inhibe les effets bénéfiques des œstrogènes sur la pathologie amyloïde tout en maintenant une diminution de la phosphorylation de tau (Carroll et al., 2007).

Les différences liées au sexe dans le développement de la MA chez l'Homme sont encore controversées. Les estimations montrent que la majorité des patients atteints de la MA sont des

femmes, que l'incidence de développer la MA est plus importante chez les femmes que chez les hommes après 80 ans (pour revue (Mielke et al., 2014)) et que l'espérance de vie des femmes est plus longue que celle des hommes après diagnostic (Rountree et al., 2012). Différentes hypothèses peuvent entrer en ligne de compte : l'espérance de vie plus longue des femmes, les effets protecteurs des œstrogènes avant la ménopause ou encore les différences de style de vie entre les hommes et les femmes (éducation, sport, cigarette); bien que ces différences de style de vie tendent à disparaître. Ces résultats soulèvent l'importance de l'étude des hormones sur le développement de la MA et notamment l'impact des thérapies hormonales post-ménopause chez les femmes.

Les souris 3xTg-AD de notre laboratoire ont un phénotype moins agressif que les souris développées par l'équipe de F. LaFerla et nous avons montré une différence de phénotype liée au sexe. Lors de ce projet, nous n'avons pas évalué l'impact du sexe sur la totalité des index que nous avons mesurés. Une analyse préliminaire est en cours concernant le métabolisme énergétique.

2) La réactivité astrocytaire

La réactivité astrocytaire est souvent associée à un changement de la morphologie de ces cellules gliales. Elles deviennent hypertrophiques et l'expression de différents marqueurs augmente, en particulier la GFAP et la vimentine. Cette réactivité est une caractéristique de nombreuses maladies neurodégénératives (Ben Haim et al., 2015) et notamment de la MA (Rodriguez-Arellano et al., 2015).

Une analyse immuno-histologique de l'hippocampe (CA1) et du subiculum a révélé une augmentation du marquage GFAP seulement dans le subiculum des souris 3xTg-AD âgées de 12 mois. Cette réactivité est concomitante de l'apparition des plaques A β dans cette région. Afin d'analyser plus en détail la morphologie des astrocytes, nous avons effectué une analyse de Sholl cellule par cellule. Cette analyse est, à notre connaissance, la première étude de la réactivité astrocytaire réalisée chez des souris modèle de la MA à haute résolution et permettant l'analyse de fines différences morphologiques pouvant échapper à une analyse globale. L'équipe d'A. Verkhratsky a réalisé plusieurs études de la réactivité astrocytaire chez les souris 3xTg-AD (Olabarria et al., 2010, Yeh et al., 2011). Ils ont, comme nous, utilisé le marquage GFAP mais ils ont distingué les astrocytes en fonction de leur proximité des plaques A β . Cependant, leur étude de la surface et du volume des astrocytes ne tient pas compte de l'état de ramification des cellules.

Dans la région CA1, notre étude n'a pas montré de différence morphologique (index de ramification (IR) et superficie) des astrocytes. Nous pouvons tout de même observer une tendance à l'augmentation de l'IR avec l'âge quelle que soit la souche de souris. Dans le subiculum, où la pathologie amyloïde est plus importante que dans le CA1, les astrocytes des souris 3xTg-AD ont une superficie et un IR supérieurs à ceux des souris contrôles à 12 mois. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de

l'équipe d'A. Verkhratsky montrant une diminution de la taille des astrocytes dans la région CA1 de l'hippocampe mais une augmentation de leur taille à proximité des plaques A β (Olabarria et al., 2010). Cela peut s'expliquer par l'absence de plaques dans la région CA1 de nos souris âgées de 6 et 12 mois. Concernant le subiculum, nous n'avons pas discriminé les astrocytes proches des plaques A β de ceux éloignés mais leur distribution montre une augmentation de la taille de tous les astrocytes chez les 3xTg-AD (quelle que soit leur proximité des plaques A β). La même équipe a aussi décrit les astrocytes d'une autre région, le cortex entorhinal, comme hypotrophiques chez les souris 3xTg-AD même en présence de plaques A β (Yeh et al., 2011). Une autre étude ne montre pas d'activation des astrocytes des souris 3xTg-AD de la région CA1 ou du subiculum malgré la présence de plaques A β et de tau hyperphosphorylée à l'âge de 12 mois (Mastrangelo and Bowers, 2008).

Les données générées lors de notre analyse de Sholl pourraient servir à étudier les différences morphologiques des astrocytes des souris contrôles en fonction de l'âge et/ou de la région étudiée (CA1 et subiculum). L'observation de ces données laisse penser que les astrocytes du subiculum ont une superficie globalement plus faible que ceux de la région CA1 et qu'avec l'âge, l'IR des astrocytes de la région CA1 augmente. Des analyses statistiques seront nécessaires afin de valider ces observations.

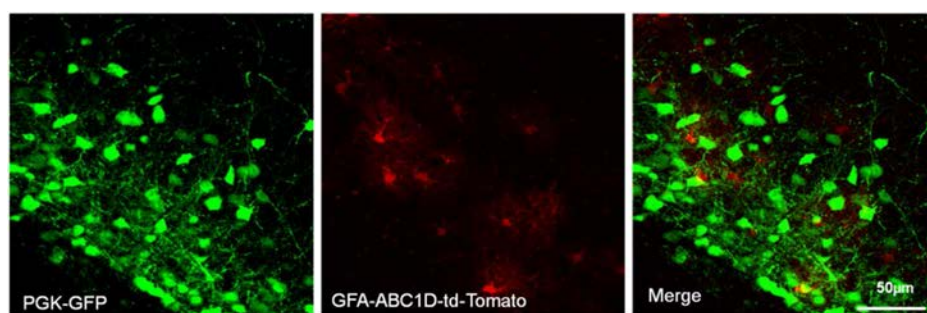


Figure 61. Expression de la GFP dans les neurones et de la td-Tomato dans les astrocytes.

Observation de l'expression d'un AVV-2/10 codant pour la GFP sous contrôle d'un promoteur neuronal(PGK) et d'un AVV-2/9 codant pour la td-Tomato sous contrôle d'un promoteur astrocytaire (GFA-ABC1D) dans l'hippocampe de souris WT.

Notre étude, fondée sur l'expression de la GFAP, pourrait être complétée par une étude morphologique des astrocytes fondée sur l'expression de S100 β . En effet, certains astrocytes expriment peu la GFAP mais expriment la S100 β (Emsley and Macklis, 2006). De plus, chez la souris, la GFAP est peu exprimée par les astrocytes du cortex, limitant l'utilisation de ce marqueur. L'utilisation d'une protéine astrocytaire ubiquitaire et présente dans le cytoplasme des cellules serait idéale pour une étude morphologique plus approfondie. La protéine PHGDH répond à ces critères et pourrait donc servir de protéine de référence pour l'étude morphologique des astrocytes. De plus, elle possède l'avantage d'être exprimée par la plupart des astrocytes, notamment les astrocytes corticaux. En revanche, son expression n'est pas modifiée en cas de réactivité astrocytaire; il faudrait donc l'utiliser en combinaison avec la GFAP ou la vimentine dont les expressions sont augmentées en cas de réactivité astrocytaire. Un autre moyen

d'étudier la morphologie des astrocytes est l'utilisation de protéines fluorescentes (comme la td-Tomato ou la GFP) exprimées sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Pour cela, les AAVs développés dans ce projet permettent l'expression de protéines fluorescentes dans différents types cellulaires (astrocytes ou neurones). Ils peuvent même être utilisés en combinaison afin d'obtenir des astrocytes d'une couleur et des neurones d'une autre couleur et cela dans la même région, permettant ainsi l'étude des interactions entre ces types cellulaires grâce à l'utilisation de microscope à haute résolution STED (STimulated Emission Depletion) par exemple (**Figure 61**).

L'étude de l'hétérogénéité astrocytaire est un domaine en pleine expansion et notre travail illustre bien la nécessité de l'aborder à l'échelle cellulaire et non plus à l'échelle régionale. Chez les souris contrôles, au sein d'une même région (CA1 ou subiculum), nous observons une hétérogénéité de superficie et de ramification des astrocytes. Nous avons également mis en évidence des différences d'indice de ramification et de superficie des astrocytes chez les souris 3xTg-AD mais uniquement dans le subiculum et pas dans la région CA1, ce qui illustre la différence de susceptibilité régionale de ces cellules gliales.

B. La D-sérine : un acide aminé essentiel à la transmission synaptique

Les souris 3xTg-AD âgées de 7 mois présentent des altérations de la transmission synaptique. Nos collaborateurs S. Oliet, A. Panatier et J. Veran ont en effet confirmé que nos souris présentent une altération de la LTP comme initialement montré par (Oddo et al., 2003b).

Les expériences menées à Bordeaux ont permis de montrer que ce déficit de LTP peut être restauré par ajout de D-sérine, suggérant un déficit de production de cet acide aminé ou de sa libération. Ces deux hypothèses ont été étudiées lors de ce projet.

1) Etude de la production de D-sérine

a) La SRR : localisation, expression et activité

La D-sérine est un acide aminé dont la production est compartimentée par l'expression d'enzymes de la voie de production dans des types cellulaires distincts. La SRR, initialement localisée uniquement dans les astrocytes, a été retrouvée ces dernières années à la fois dans les astrocytes et dans les neurones (Wolosker et al., 1999, Miya et al., 2008, Ehmsen et al., 2013). Plus récemment, l'étude transcriptomique conduite par l'équipe de B. Barres a montré une expression de la SRR dans les astrocytes et les neurones mais aussi dans les cellules microgliales et les oligodendrocytes (Zhang et al., 2014). Le RNAseq, bien qu'étant un puissant outil d'analyse à grande échelle, doit être utilisé avec précaution. La présence des transcrits de certains gènes ne permet pas d'affirmer que la protéine est présente et qu'elle est fonctionnelle. Une étude préliminaire de la localisation de la SRR dans la région CA1 semble indiquer une localisation majoritairement neuronale de cette enzyme (**Figure 62**).

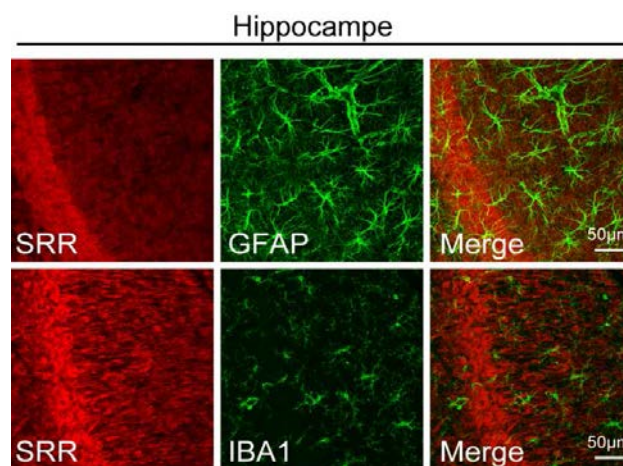


Figure 62. Expression de la SRR et de la GFAP dans la région CA1 de souris contrôles.

Des coupes de souris contrôles de 6 mois ont été immuno-marquées afin de révéler les protéines SRR et GFAP. Abréviations : gyrus denté (DG).

Néanmoins, il est établi que la GFAP ne reflète pas la complexité des astrocytes et ne permet la visualisation que d'environ 15% de la cellule (Bushong et al., 2002) : si la SRR a une localisation cytoplasmique, nous ne pourrions pas l'observer avec un marquage GFAP. L'utilisation d'un marqueur astrocytaire cytoplasmique comme la PHGDH ou de souris transgéniques (la souche GLT1-GFP par exemple) permettant l'observation des astrocytes dans leur intégralité, pourrait établir plus précisément la localisation de la SRR. L'absence de co-localisation entre le marquage IBA1 et celui de la SRR indique que les cellules microgliales ne semblent pas exprimer la SRR. Cette présence majoritairement neuronale semble en accord avec une étude récente d'identification de la localisation de la SRR et de la D-sérine. Cette étude histologique, utilisant des souris SRR-KO comme contrôle négatif, a montré que la majorité (~90%) de la SRR et de la D-sérine était localisée dans les neurones et qu'une petite fraction de SRR et de D-sérine (~10%) était observée dans les astrocytes (Ehmsen et al., 2013).

Bien que cette localisation de la SRR soit encore débattue dans la communauté scientifique, la contribution de l'enzyme dans chaque type cellulaire (neurone ou astrocyte) a été récemment mise en évidence. En invalidant l'enzyme SRR dans les neurones ou les astrocytes, les chercheurs ont montré une diminution de 65% et de 15% de l'expression totale de la SRR, respectivement. La diminution de la SRR astrocytaire ne modifie pas la concentration totale en D-sérine et ne conduit pas à une altération de la LTP ; contrairement à la diminution de SRR neuronale qui contribue significativement à la production de D-sérine cérébrale. Une diminution de la concentration en D-sérine de 14% dans l'hippocampe et de 35% dans le cortex est observée. De plus, dans l'hippocampe, cela conduit à une altération de la LTP (Benneyworth et al., 2012). Cette diminution modeste de la concentration en D-sérine peut s'expliquer par la mise en place de mécanismes de compensation (augmentation de la production de D-sérine par le type cellulaire n'ayant pas d'inactivation de l'enzyme SRR) ou bien par le fait que la SRR possède deux activités enzymatiques : la racémisation et une activité d'élimination- α,β induisant la dégradation de la L-/D-sérine (Foltyn et al., 2005). La diminution de production de D-sérine pourrait être compensée par une diminution de sa dégradation.

Notre étude par western blot de l'expression de la SRR, qui ne permet pas de discriminer l'expression des protéines dans les différents types cellulaires, n'a pas mis en évidence de différence d'expression entre les souris contrôles et les souris 3xTg-AD, suggérant une absence globale d'altération de l'expression de cette enzyme dans l'hippocampe et le subiculum.

Il serait aussi intéressant de tester l'activité de cette enzyme. L'activation des NMDAR entraîne une translocation de la SRR du cytosol à la membrane dendritique pouvant entraîner une diminution de son activité (Balan et al., 2009). Cette activation des NMDAR conduit aussi à la production de NO permettant la nitrosylation de la SRR qui a pour effet de diminuer son activité (Mustafa et al., 2007). Une autre étude très récente a démontré que l'activité de la SRR astrocytaire était en partie dépendante de la glycolyse. L'augmentation du flux glycolytique, suite à l'inhibition de la phosphorylation oxydative, entraîne une diminution de la production de D-sérine alors que l'inhibition de la glycolyse provoque l'augmentation de la synthèse de D-sérine (Suzuki et al., 2015). L'activité de la SRR est inhibée par son interaction avec la GAPDH. L'hypométabolisme que nous observons dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD pourrait donc entraîner une diminution de l'interaction entre la GAPDH et la SRR et donc

augmenter l'activité de la SRR. Cela expliquerait l'augmentation de la concentration de D-sérine observée chez les souris 3xTg-AD.

L'étude de Suzuki et al. réalisée *in vitro* sur des cultures primaires d'astrocytes pourrait être reproduite sur des cultures neuronales afin d'évaluer si les mécanismes de régulation de la SRR dans ce type cellulaire, qui ne possède pas les mêmes capacités de contrôle du flux glycolytique, sont identiques à celles des astrocytes.

Deux études *in vitro* ont montré que l'exposition de cellules microgliales au peptide A β provoque l'augmentation de l'expression de la SRR dans ces cellules ainsi que la libération de D-sérine (Wu et al., 2004, Wu et al., 2007). Le LPS (LipoPolySaccharide), induisant l'activation des cellules microgliales, entraîne le même effet. Ces cellules pourraient être une source supplémentaire de D-sérine dans la MA où elles adoptent un phénotype activé. De nouvelles études sont nécessaires pour déterminer la contribution des différents types cellulaires à la production et libération de D-sérine.

Notre étude de la SRR, enzyme intervenant lors de la dernière étape de la production *de novo* de D-sérine, n'a pas mis en évidence de modification de son expression entre les souris contrôles et les souris 3xTg-AD. D'autres expériences sont requises pour conclure sur son éventuelle implication dans l'altération fonctionnelle de la voie de synthèse L- et D-serine observée chez les souris 3xTg-AD.

b) La PHGDH : localisation, expression et activité

La L-sérine est un acide aminé précurseur de nombreuses molécules telles que des protéines, des acides aminés (glycine, D-sérine), des sphingolipides ou encore des nucléotides. La principale source de L-sérine cérébrale provient de la diversion du flux glycolytique par l'enzyme PHGDH (Furuya, 2008). La synthèse de L-sérine est essentielle au développement cérébral. Ainsi, les patients souffrant d'une déficience de l'une des enzymes de la voie de synthèse de la L-sérine (PHGDH, PSAT ou PSPH ; syndrome de Neu-Laxova) présentent plusieurs symptômes neurologiques : microcéphalie, retard psychomoteur et crises d'épilepsie (Acuna-Hidalgo et al., 2014). Des modèles animaux invalidés pour l'expression de la PHGDH (PHGDH-KO) ont été générés. L'invalidation de la PHGDH induit une létalité embryonnaire (Yoshida et al., 2004), démontrant son rôle indispensable lors du développement. Elle est aussi indispensable à la production de L-sérine à l'âge adulte, son invalidation conditionnelle spécifiquement dans les astrocytes à l'âge adulte diminuant la quantité de L-sérine, D-sérine et glycine (de 85%, 90% et 60%, respectivement) dans l'hippocampe (Yang et al., 2010).

L'enzyme PHGDH est une protéine exclusivement exprimée dans les astrocytes chez l'animal adulte (Yamasaki et al., 2001). Au cours du développement, les neurones perdent l'expression de la PHGDH et deviennent dépendants de la L-sérine astrocytaire (Furuya et al., 2008). Cependant, nous avons pu

observer que la PHGDH, en plus des astrocytes, est aussi faiblement exprimée par les cellules microgliales. Cela est aussi montré par l'équipe de B. Barres qui, en plus de l'expression microgliale et astrocytaire de la PHGDH, a retrouvée de la PHGDH dans les oligodendrocytes (Zhang et al., 2014). Cette expression strictement gliale confère à ces cellules un rôle primordial dans la production *de novo* de L-sérine. La participation des cellules microgliales et des oligodendrocytes dans la production du pool cérébral de L-sérine reste à déterminer.

L'expression de PHGDH s'accroît dans certaines conditions pathologiques comme une lésion à l'acide kaïnique (entraînant une mort neuronale) et dans les cellules cancéreuses (Jeon et al., 2009, Locasale et al., 2011) mais pas après une ischémie cérébrale malgré l'augmentation de production de L-sérine (Abe et al., 2014). Dans la MA, cette enzyme n'a jamais été étudiée bien que de nombreuses études aient mesuré les niveaux de L-/D-sérine chez les patients atteints de la MA (Nagata et al., 1995, Hashimoto et al., 2004, Madeira et al., 2015).

L'augmentation de l'expression de la PHGDH dans les cellules cancéreuses favorise la déviation du flux glycolytique, au niveau de l'intermédiaire 3-phosphoglycérate (3PG), dans la voie de production de la L-sérine. Cette production de L-sérine est nécessaire à la prolifération des cellules cancéreuses (Locasale et al., 2011). L'étude du métabolisme des cellules cancéreuses par ajout de glucose radio-marqué au carbone 13 (^{13}C) a permis de montrer que la PHGDH dévie ~2% du flux glycolytique en condition normale et jusqu'à 9% dans les cellules cancéreuses (Possemato et al., 2011).

En utilisant une approche transcriptionnelle, l'équipe d'E. Hol a montré que les astrocytes corticaux des souris âgées exprimaient moins la PHGDH que les astrocytes des souris jeunes (Orre et al., 2014b). La diminution de l'expression de la PHGDH avec l'âge semble être une caractéristique commune aux astrocytes de différentes régions (cortex, hippocampe, subiculum). Cependant, nos travaux montrent que les souris 3xTg-AD ne présentent pas de diminution moyenne de la PHGDH mais plutôt une modification de l'expression de la PHGDH au sein de la population astrocytaire : les souris 3xTg-AD possèdent des astrocytes exprimant très peu la PHGDH et d'autres l'exprimant fortement alors que les souris contrôles ont une expression plus homogène de la PHGDH. Cette modification d'expression locale est associée à des déficits de synthèse de L-sérine mesurée par EC-LIF. Il serait intéressant de déterminer si des changements d'expression de la PHGDH se retrouvent dans d'autres modèles de la MA et chez les patients.

La régulation de la production de la L-sérine a été plus particulièrement étudiée dans le contexte du cancer. Dans les cellules cancéreuses, la L-sérine est un régulateur de la voie de la glycolyse et aussi de sa propre synthèse. L'absence de L-sérine entraîne une diminution de l'activité de la PKM2 (pyruvate kinase M2) et donc une déviation du pool de pyruvate de la mitochondrie pour la voie de production de la L-sérine (Chaneton et al., 2012). La diminution de la quantité de L-sérine que nous observons chez les souris 3xTg-AD pourrait conduire à une inhibition de l'activité de la PKM2, enzyme spécifiquement exprimée dans les astrocytes. Cette inhibition de la PKM2 pourrait diminuer le flux glycolytique afin d'alimenter la voie de production de la sérine pour restaurer les niveaux physiologiques de L-sérine.

Les souris 3xTg-AD présentent une modification d'expression locale de la PHGDH astrocytaire associée à une altération globale de la production de L-/D-sérine dans l'hippocampe. Les mécanismes qui régulent l'activité de la PHGDH ne sont pas encore bien connus. Des études de co-immunoprécipitation permettraient par exemple d'identifier ses possibles interacteurs.

c) Les autres enzymes impliquées dans le métabolisme de la L-/D-sérine

Outre la SRR et la PHGDH, d'autres enzymes sont indispensables à la régulation de la synthèse de L-/D-sérine (**Figure 63**).

La PSAT et la PSPH, les deux autres enzymes nécessaires à la synthèse *de novo* de L-sérine, sont préférentiellement exprimées dans les cellules gliales (Orre et al., 2014b, Zhang et al., 2014). Il n'existe pas, à ma connaissance, d'études histologiques confirmant l'expression de ces enzymes dans les cellules gliales. L'activité de ces protéines chez les souris 3xTg-AD pourrait être testée grâce à des tests enzymatiques déjà décrits dans la littérature (Verleysdonk and Hamprecht, 2000).

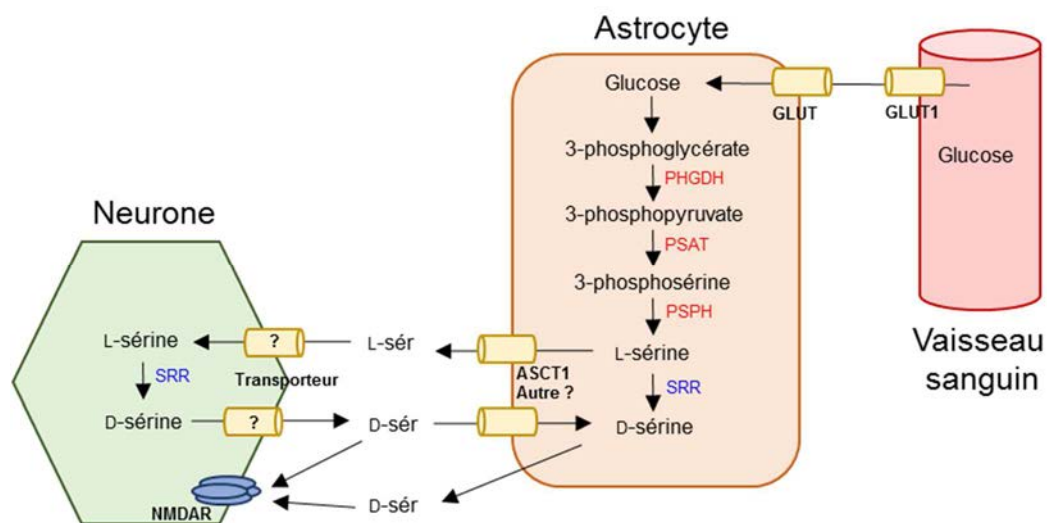


Figure 63. Schéma hypothétique de la production et du transport de L-sérine et D-sérine entre les neurones et les astrocytes.

Les enzymes en rouge sont majoritairement astrocytaires et la localisation de la SRR (en bleu) est toujours débattue. Figure adaptée de (Wolosker and Radzishevsky, 2013).

Comme pour la PHGDH, les enzymes PSAT et PSPH sont légèrement moins exprimées dans les astrocytes des souris âgées par rapport aux astrocytes des souris jeunes (Orre et al., 2014b). Une autre étude transcriptomique d'Orre et al. effectuée sur des astrocytes isolés de souris modèle de la MA a montré une diminution de l'expression des transcrits PHGDH, PSAT et PSPH (Orre et al., 2014a). Ces souris APP/PS1 n'expriment pas de mutations de la protéine tau, suggérant un rôle prépondérant d'Aβ. Dans ce projet, nous avons développé des AAVs permettant l'expression de protéines fluorescentes

spécifiquement dans les astrocytes et notre laboratoire maîtrise la technique de tri cellulaire par FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), une analyse des transcrits des astrocytes des souris 3xTg-AD à différents âges permettrait d'identifier les gènes différentiellement exprimés chez ces souris par rapport aux contrôles.

Mise à part la production de L-sérine, un autre moyen de réguler la quantité de D-sérine cérébrale est de moduler l'activité de l'enzyme la dégradant : la DAAO. Cette enzyme catalyse la désamination des D-acides aminés. Son activité peut être inhibée par le benzoate. Afin de réguler l'activation des NMDAR dans le cerveau des patients atteints de la MA, différents essais cliniques ont été menés afin d'augmenter la quantité de D-sérine cérébrale soit par l'action de la D-cyclosérine ou par traitement avec le benzoate mais les résultats sont mitigés (Laake and Oeksengaard, 2002, Lin et al., 2014). L'état d'avancement de la MA au moment du traitement et la durée du traitement semblent être les deux paramètres à maîtriser pour obtenir une meilleure efficacité.

2) Libération de L-/D-sérine

La production de L-sérine est très majoritairement astrocytaire. En revanche, quels types cellulaires produisent la D-sérine et comment la L- et D-sérine sont libérées restent des questions dont les réponses sont encore contradictoires.

La D-sérine est présente majoritairement dans les neurones mais également dans les astrocytes (Ehmsen et al., 2013). Dans les astrocytes, la libération de D-sérine est dépendante d'une augmentation cytoplasmique de Ca^{2+} . En clamping le calcium astrocytaire *ex vivo*, la libération de D-sérine astrocytaire est altérée ainsi que la LTP (Henneberger et al., 2010). L'augmentation du calcium peut être induit par une large population de récepteurs (pour revue (Martineau et al., 2014)). Dans les neurones, la dépolarisation entraîne une libération de D-sérine. Cela a été montré *in vitro* sur des cultures primaires de neurones, *ex vivo* sur des tranches ainsi que dans le striatum de souris par microdialyse (Rosenberg et al., 2010).

Plusieurs hypothèses sont possibles (**Figure 63**) :

- Production de D-sérine dans les astrocytes
- Production de D-sérine dans les neurones (transfert de L-sérine des astrocytes aux neurones)
- Stockage de la D-sérine dans les astrocytes (produite par eux-mêmes ou bien après production et transfert de la D-sérine neuronale, c'est l'hypothèse de "sérine shuttle" émise par (Wolosker, 2011))
- Stockage de la D-sérine dans les neurones (Ehmsen et al., 2013)
- Libération de la D-sérine au niveau de la fente synaptique par les astrocytes (Henneberger et al., 2010) et/ou par les neurones (Rosenberg et al., 2010)

a) Les transporteurs des acides aminés neutres

De nombreuses études *in vitro* ont essayé de déterminer quels étaient les différents transporteurs responsables de la libération de L-/D-sérine en utilisant des techniques de dosage par HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) couplée à la microdialyse ou à l'aide de biosenseurs. Cependant, aucun consensus n'a pour l'instant été trouvé.

Le transport des acides aminés neutres est réalisé par plusieurs familles de transporteurs (système Asc ou ASCT).

Le transporteur ASCT1 a tout d'abord été identifié dans les astrocytes (Sakai et al., 2003) *in vivo* mais par la suite différentes études ont montré que ce transporteur est aussi exprimé dans les neurones *in vitro* (Yamamoto et al., 2004). Les données de transcriptomique semblent confirmer l'expression d'ASCT1 principalement dans les astrocytes (Zhang et al., 2014). Notre étude montre une parfaite co-localisation entre ASCT1 et GLT1, démontrant une expression strictement astrocytaire de ce transporteur.

Les cultures primaires de neurones et d'astrocytes indiquent que le transporteur ASCT2 est principalement exprimé par les astrocytes (Bröer et al., 1999). En transcriptomique aussi, le gène ASCT2 est majoritairement astrocytaire (Zhang et al., 2014). L'étude de sa localisation cellulaire dans le cerveau de souris contredit ces résultats. *In vivo*, ASCT2 a été observé exclusivement dans les neurones dans différentes régions (cortex, striatum, hippocampe), excepté dans la rétine où ASCT2 co-localise avec la GFAP (Gliddon et al., 2009).

Aucune étude *in vivo* n'a identifié la localisation cellulaire d'Asc-1 bien que son transcrit soit principalement exprimé dans les astrocytes (Zhang et al., 2014).

Le manque d'agents pharmacologiques spécifiques n'a pas permis l'étude fonctionnelle de ces différents transporteurs. Le développement d'un inhibiteur d'Asc-1 (Brown et al., 2014) permettra de mieux appréhender les échanges des acides aminés L- et D-sérine entre les neurones et les astrocytes.

Ces différents transporteurs n'ont pas la même affinité pour la D-sérine. Asc-1 présente une forte affinité pour cet acide aminé ($K_m = 20 \mu M$) (Rutter et al., 2007) alors qu'ASCT2 et ASCT1 ont une faible affinité pour la D-sérine ($K_m = 1 mM$) (Shao et al., 2009). Asc-1 se présente donc comme le principal transporteur de la D-sérine, avec notamment un rôle prépondérant dans l'élimination de la D-sérine extracellulaire. Son invalidation dans le cerveau de souris entraîne une diminution de 70% de la recapture de la D-sérine (Rutter et al., 2007). Cependant le rôle des transporteurs ASCT n'est pas négligeable dans l'homéostasie cérébrale de la sérine, une mutation dans le gène ASCT1 provoque des retards développementaux, des microcéphalies ainsi que des crises d'épilepsie: des symptômes cliniques proches de ceux causés par une déficience de production de L-sérine (Damseh et al., 2015).

b) Libération vésiculaires de la D-sérine

Un autre moyen de transport de la D-sérine a récemment été identifié, il s'agit des vésicules astrocytaires (Martineau, 2013). La localisation de la SRR proche de ces vésicules suggère un couplage fonctionnel entre la production de D-sérine et son entrée dans les vésicules (Martineau, 2013). Ce domaine d'étude des vésicules astrocytaires transportant des acides aminés est très récent, d'autres expériences seront nécessaires avant de pouvoir déterminer le transporteur permettant l'entrée de D-sérine dans les vésicules et les mécanismes moléculaires entraînant la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique.

Lors de ce projet, nous avons suivi l'hypothèse d'une altération de la libération de la D-sérine ou du "shuttling" de son précurseur, la L-sérine. Nos données acquises sur les souris 3xTg-AD montrent tout l'intérêt qu'il y aurait à étudier ces échanges intercellulaires de L- et D-sérine dans la MA, éventuellement à des fins thérapeutiques.

C. Le métabolisme énergétique : implication dans la production de D-sérine

La L-sérine cérébrale est produite par déviation du flux glycolytique par la PHGDH. Une modification de ce flux pourrait donc entraîner une altération de la production de L-sérine et par conséquent de la D-sérine. L'étude du métabolisme énergétique cérébral *in vivo* par autoradiographie offre des données comparables à celles obtenues chez les patients même si elle ne permet pas d'obtenir une résolution cellulaire.

1) L'amyloïde- β : perturbateur du métabolisme énergétique ?

Plusieurs études du métabolisme énergétique cérébral de modèles murins de la MA ont montré des résultats variables selon les structures observées, le modèle et l'âge des souris au moment de l'expérience (Niwa et al., 2002, Valla et al., 2006, Valla et al., 2008, Nicholson et al., 2010). Une étude des souris 3xTg-AD à 2, 12 et 18 mois, sans distinction mâle/femelle, a été effectuée par l'équipe de J. Valla. Ils observent un hypométabolisme dans toutes les régions étudiées (Nicholson et al., 2010). Cependant, la segmentation manuelle des régions d'intérêts (ROI) peut entraîner une perte d'information : des clusters à la fois et hypo- et hypermétaboliques peuvent être présents au sein d'une même structure anatomique (Dubois et al., 2010). L'analyse par SPM a ainsi permis l'identification de clusters hypo- et hypermétaboliques dans l'ensemble du cerveau des souris femelles 3xTg-AD, dès l'âge de 6 mois où il n'y a pas de plaques A β mais seulement de l'A β intracellulaire. L'A β soluble est donc suffisant pour induire des altérations du métabolisme cérébral chez les souris 3xTg-AD mais aussi dans d'autres modèles murins de la MA (Niwa et al., 2002). Certains clusters hypermétaboliques à 6 mois ont été ensuite identifiés comme hypométaboliques à 12 mois, notamment dans le striatum. Cela suggère que des mécanismes de compensation se mettent en place tôt dans le développement de la MA. Une étude du métabolisme cérébral par ^{13}C -RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) des souris 3xTg-AD âgées de 7 et 13 mois a montré une évolution de leur statut métabolique d'hyper- à hypométabolique, respectivement (Sancheti et al., 2014a, Sancheti et al., 2014b).

Les clusters hypométaboliques détectés dès l'âge de 6 mois dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD, sont retrouvés chez les souris de 12 mois de façon plus étendue : une aggravation de l'altération métabolique est observée. Cette diminution de l'entrée de glucose dans la voie de la glycolyse dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD reflète vraisemblablement une diminution du flux glycolytique astrocytaire et donc une diminution probable de la quantité de 3PG, le substrat de la PHGDH.

L'amyloïde- β pourrait directement ou indirectement contribuer à l'hypométabolisme en agissant sur l'expression des transporteurs au glucose, sur l'expression des enzymes de la glycolyse ou encore sur le flux sanguin permettant l'apport de glucose au cerveau. L'amyloïde- β induit la diminution de la localisation de transporteur GLUT4 à la membrane des neurones (Oliveira et al., 2015) alors que des astrocytes exposés à ce peptide présentent plutôt un état hypermétabolique (Allaman et al., 2010, Fu et al., 2015). Les astrocytes en culture exposés à l'A β montrent une augmentation de l'utilisation de glucose, de leur libération de lactate et de GSH (Allaman et al., 2010). Cette augmentation du

métabolisme semble délétère pour la viabilité neuronale (Allaman et al., 2010). L'équipe de J. Jhamandas a aussi démontré que l'augmentation du métabolisme astrocytaire lors d'une exposition à l'A β serait médiée par l'augmentation de l'expression de PFKFB3, régulateur positif de la glycolyse (Fu et al., 2015). Contrairement à l'étude menée par I. Allaman et al., les résultats de Fu et al. soutiennent l'hypothèse que l'augmentation du métabolisme des astrocytes exposés à l'A β est bénéfique pour ces cellules et les rendrait plus résistantes à la toxicité liée à l'A β . En effet, l'inhibition de PFKFB3 dans les astrocytes exposés à l'A β entraîne une augmentation de l'accumulation d'A β (Fu et al., 2015). Ils ont montré que l'expression de la PFKFB3 est augmentée chez des souris modèles de la MA à des stades tardifs. L'analyse de cette protéine PFKFB3 chez les souris 3xTg-AD pourrait nous donner des indications quant au statut du flux glycolytique des astrocytes de ces souris à 6 et 12 mois.

Deux études récentes ont montré que l'expression des transporteurs GLUT3, GLUT4 et GLUT1 est diminuée chez les souris modèle de la MA (Chen et al., 2012, Do et al., 2014). Le croisement de souris déficientes dans l'expression endothéliale de GLUT1 avec des souris modèles de la MA entraîne une accélération de la pathologie amyloïde, une diminution de l'activité neuronale et de l'élimination d'A β (Winkler et al., 2015).

La modification du métabolisme cérébral du glucose est un marqueur précoce de la MA retrouvé chez les patients et dans de nombreux modèles animaux. Cependant le rôle de l'A β dans ces processus *in vivo* n'est pas connu : interaction directe, modification de la localisation ou perturbation de l'expression des transporteurs, modification du flux vasculaire... L'A β pourrait intervenir de façon différente en fonction du type cellulaire, du type de récepteur et de sa propre localisation intra- ou extracellulaire.

2) Etude du métabolisme avec une résolution spatiale élevée

La technique autoradiographique ne possède pas une résolution suffisante pour identifier le type cellulaire majoritairement impliqué dans l'altération métabolique identifiée dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD. Ces dernières années, le développement des sondes FRET sensibles à différents métabolites énergétiques a permis de suivre et de mesurer à l'échelle cellulaire des variations de concentration de ces métabolites (lactate, pyruvate, glucose) *in vitro* et même sur des tranches de cerveau (Bittner et al., 2010, Sotelo-Hitschfeld et al., 2012, Lerchundi et al., 2015). L'utilisation de ces sondes dans les neurones et les astrocytes de l'hippocampe des souris 3xTg-AD permettrait l'étude, dans un contexte pathologique, des flux métaboliques au sein d'un type cellulaire spécifique.

Grâce au développement de vecteurs viraux AAV permettant l'expression spécifique dans les neurones ou les astrocytes *in vivo*, les résultats préliminaires que nous avons obtenus avec la sonde sensible au glucose ne montrent pas de différence entre les souris 3xTg-AD et les souris WT en réponse à un retrait du glucose extracellulaire. Actuellement, des expériences sont réalisées avec la sonde FRET sensible

au lactate afin d'observer si l'expression des transgènes APP/PS1/tau influence la vitesse du flux glycolytique dans les astrocytes.

L'une des limitations de l'utilisation des sondes FRET sur des tranches est la difficulté de les calibrer afin d'obtenir des données quantitatives et donc comparables entre deux groupes de souris. Les études *in vitro* sont plus favorables à la réalisation d'expériences de FRET quantitatives. Ainsi, grâce à une collaboration avec F. Barros et R. Lerchundi du CECs à Valdivia au Chili, nous avons mené un projet de quelques semaines sur l'étude du métabolisme des cellules HEK cultivées en présence ou non des protéines mutées d'APP, PS1 ou tau. Cette étude *in vitro* avait pour objectif de mesurer les changements de concentration en glucose dans les cellules en l'absence de glucose extracellulaire ou en bloquant les transporteurs au glucose (avec la cytochalasine B). Malheureusement des difficultés techniques et une durée de séjour limitée n'ont pas permis d'obtenir de résultats pertinents.

Dans le cadre de ce projet, une étude FRET utilisant des cultures primaires d'astrocytes et de neurones isolés de souris 3xTg-AD et de souris contrôles serait plus appropriée que l'utilisation de cellules HEK.

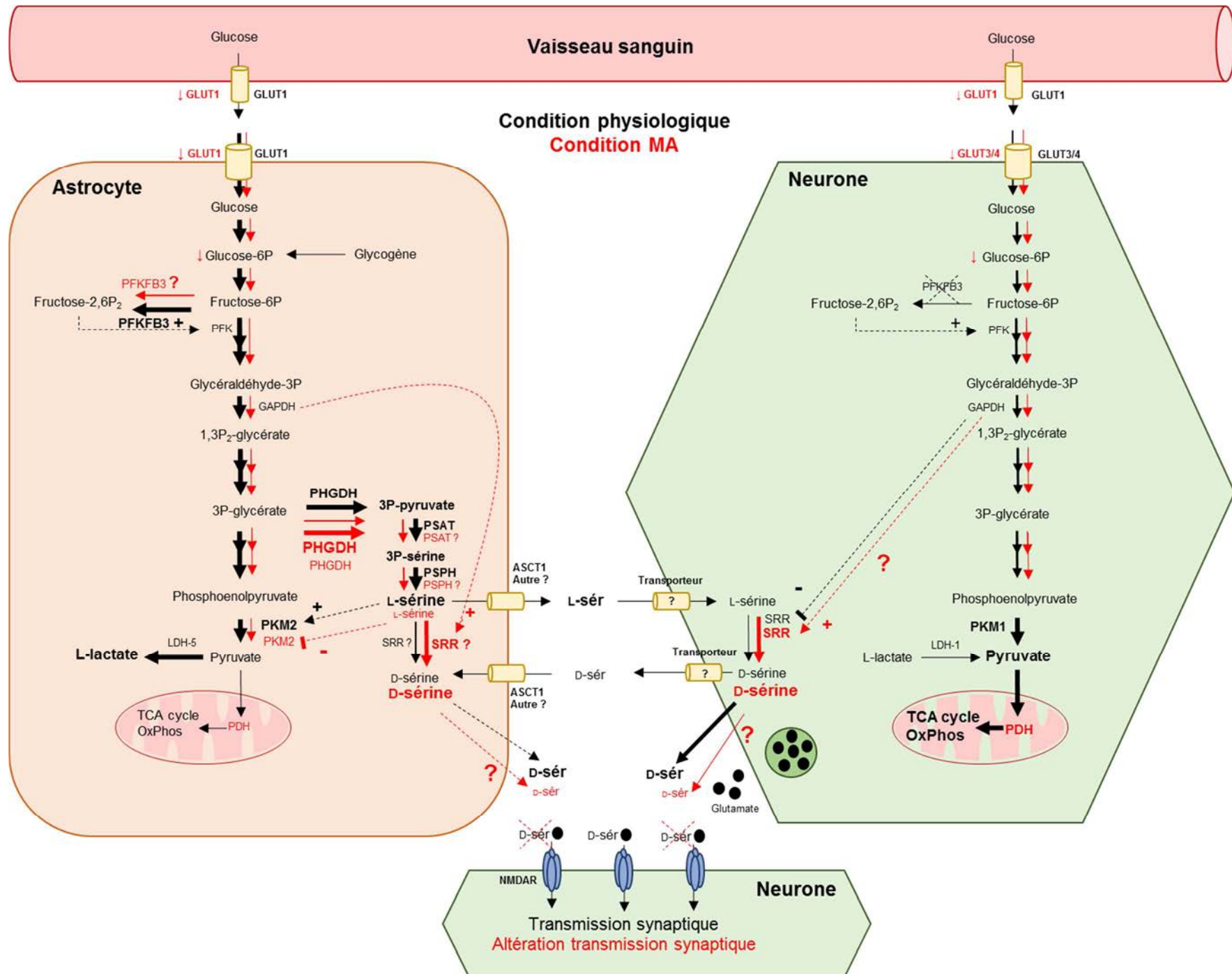
Les outils FRET permettent l'étude des flux métaboliques à haute résolution spatiale et temporelle bien que leur utilisation en tranche nécessite encore des développements. L'observation de ces flux en temps réel permettra probablement d'identifier les mécanismes cellulaires contribuant au déficit métabolique observé dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD.

D. Modèle proposé

En se basant sur la littérature et les résultats obtenus lors de ce projet, voici un schéma permettant de poser les hypothèses du modèle que nous proposons (**schéma récapitulatif**).

Ce schéma reprend les différents points abordés dans la discussion et suggère un nouveau lien mécanistique entre le métabolisme énergétique et l'activité synaptique. Notre hypothèse ne se base pas sur le déficit de production en ATP pour expliquer les diminutions de transmission synaptique observées chez les souris 3xTg-AD. Nous faisons plutôt l'hypothèse que la diminution du flux glycolytique astrocytaire conduit à une modification de la voie de biosynthèse de L-serine dans ces cellules gliales, ce qui a pour conséquence de réduire la quantité de D-sérine disponible à la synapse requise pour activer les récepteurs NMDA synaptiques.

De nombreuses expériences sont encore requises pour confirmer cette hypothèse et pour pouvoir éventuellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques visant à améliorer la disponibilité de D-serine à la synapse.



V. CONCLUSION GENERALE

Les interactions neurone-glie sont fondamentales pour le fonctionnement du cerveau. De nombreuses études ont montré l'importance des coopérations métaboliques entre les neurones et les astrocytes afin d'assurer l'homéostasie cérébrale. Ces cellules présentent des profils métaboliques différents qui leur confèrent des fonctions métaboliques spécialisées dans le cerveau. Elles expriment un set de gènes particulier qui assure la compartimentalisation des voies métaboliques entre ces cellules et qui leur permettent de jouer un rôle spécifique dans le cerveau (transmission rapide de l'information, état rédox, régulation du flux vasculaire et des ions...). Au cours de cette thèse nous nous sommes attachés à caractériser l'importance d'une voie de coopération métabolique entre astrocytes et neurones (la voie de biosynthèse de L-sérine) jusqu'alors inexplorée dans le contexte d'une maladie neurodégénérative. Nos données obtenues sur un modèle murin de la MA suggèrent que la dérégulation de cette voie métabolique astrocytaire pourrait avoir un impact majeur sur la transmission synaptique. De nombreuses expériences sont indispensables pour confirmer cette hypothèse et mieux définir les mécanismes moléculaires à l'origine de cette dysfonction. Des données très intéressantes et des pistes nouvelles tirées du domaine du cancer permettent déjà d'imaginer comment réaliser ces prochaines expériences sur nos souris.



ANNEXES

VI. ANNEXES

A. Abréviations

20-HETE	20-hydroxy-eicosatetraenoic acid
2DG	2-désoxyglucose
3PG	3-phosphoglycérate
A β	Amyloïd-beta
aCSF	artificial cerebrospinal fluid
ADNI	Alzheimer's disease neuroimaging initiative
ANLS	Astrocyte-neuron lactate shuttle
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor protein
AQP4	Aquaporin 4
Asc1	Na ⁺ -independent alanine–serine–cysteine transporter 1
ASCT	Na ⁺ -dependent alanine–serine–cysteine transporter
BBB	Blood brainbarrier
CFP	Cyan fluorescent protein
DAAO	D-aminoacidoxidase
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
EET	Acide Epoxyeicosatrienoique
EC-LIF	Electrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser
F2,6P ₂	Fructose-2,6-biphosphate
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FDG-PET	2-[¹⁸ F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glucose positron emissiontomography
G6P	Soluble adénylylecyclase
GDNF	Glia-derived neurotropic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GLAST	Glutamate aspartate transporter
GLT-1	Glutamate transporter -1
GPCR	G-protein coupled receptor
GSH	Glutathion
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GWAS	Genome wide association study
HEK	Human embryonic kidney cells
HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha
IDE	Insulin-degrading enzyme
IRM	Imagerie par resonance magnétique
HPLC	High-performance liquid chromatography
KI	Knock-in
Kir4.1	Inward rectifier-type potassium channel
KO	Knock-out

LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	Long term potentiation
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPK	Mitogen-activatedprotein kinase
MCT	MonoCarboxylatetransporter
mGluR	Metabotropic glutamate receptor
MT	Microtubules
NALS	Neuron-astrocyte lactate shuttle
NMDAR	N-méthyl-d-aspartate receptor
NO	Nitricoxide
PDH	Pyruvate dehydrogenase
PFK1	6-phosphofructo-1-kinase
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase, isoform 3
PG	Prostaglandine
PGK	Phosphoglycerate kinase
PHGDH	3-phosphoglycerate dehydrogenase
PKM	Pyruvate kinase M
PS1/PSEN1	Presenilin 1
PS2/PSEN2	Presenilin 2
PSAT	3-phosphoserine aminotransferase
PSD-95	Post-synaptic density-95
PSPH	Phosphoserine phosphatase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species
S100 β	S100 calcium binding protein beta
SHMT	Serine hydroxymethyltransferase
shRNA	short hairpin RNA
SRR	Serine racemase
STED	Stimulated emission depletion
TCA	Tricarboxylic acid
TRP	Transientreceptorpotential cation channel
UA	Unités arbitraires
VEGF	Vascular endothelial growth factor
YFP	Yellow fluorescent protein
xCT	Echangeur cystine/glutamate

B. Résumé des régions hyper- et hypométaboliques

Age	Région	WT Activité normalisée ±SEM (nCi/g)	3xTg-AD Activité normalisée ±SEM (nCi/g)	Pourcentage de différence	Volume des clusters (mm ³)
6 mois clusters hypermétaboliques	Thalamus et colliculi supérieurs	247 ±2	276 ±3	11,8	16,4
	Striatum	231 ±2	255 ±2	10,7	3,5
	Septum et noyaux pré-optiques	194 ±5	223 ±4	15,5	1,5
	Cortex rétrosplénial	207 ±3	235 ±3	13,6	0,5
	Cortex cingulaire	248±8	291 ±6	17,4	0,3
	Cortex insulaire antérieur	230 ±5	259 ±3	12,0	0,2
	Colliculi inférieurs	218 ±10	325 ±14	49,0	0,2
	Cortex piriforme	258 ±7	321 ±8	24,5	0,1
6 mois clusters hypométaboliques	Cortex entorhinal, piriforme et amygdale	191 ±4	169 ±4	-11,7	1,7
	Hippocampe	187 ±3	163 ±2	-12,9	0,9
	Thalamus	179 ±3	151 ±2	-15,7	0,2
12 mois clusters hypermétaboliques	Thalamus	246 ±5	281 ±6	14,1	10,7
	Cortex visuel	246 ±3	283 ±3	15,2	6,4
	Cortex piriforme	299 ±4	337 ±4	12,9	0,5
	Septum et noyaux pré-optiques	219 ±4	245 ±5	11,9	0,3
	Colliculi supérieurs	242±4	268 ±5	10,7	0,2
12 mois clusters hypométaboliques	Hippocampe	196 ±1	172 ±2	-12,1	6,6
	Cortex entorhinal, piriforme et amygdale	199 ±4	172 ±4	-13,5	1,3
	Striatum	216 ±3	189 ±2	-12,4	0,6
	Pont	178 ±4	153 ±4	-14,3	0,5
	Tubercules olfactifs	229±3	198 ±3	-13,3	0,5
	Septum	169 ±3	145 ±4	-14,1	0,5

C. Publications & communications

Oral Communications

Oral presentation at the **doctoral school Brain, Behavior and Cognition**, UPMC Paris VI, March 2014

Oral presentation at the **Institute of Biomedical Imagery**, CEA, June 2014

Posters

Poster presentation at the **doctoral school Brain, Behavior and Cognition**, UPMC Paris VI, June 2013

Poster presentation at the **Gordon conference “Functional Interactions among Glia & Neurons”**, Ventura (CA, USA), March 2015

Poster presentation at the **conference “The Brain beyond Neurons”**, Paris (France), May 2015

List of Publications

Merienne N., Le Douce J., Faivre E., Déglon N., Bonvento G. **Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors**. Front Cell Neurosci. 2013 Jul 5;7:106.

Sotelo-Hitschfeld T., Niemeyer M., Machler P., Ruminot I., Lerchundi R., Wyss M., Stobart J., Fernandez-Moncada I., Valdebenito R., Garrido-Gerter P., Contreras-Baeza Y., Schneider B., Aebischer P., Lengacher S., San Martín A., Le Douce J., Bonvento G., Magistretti P., Sepulveda F., Weber B., Barros L.F. **Channel-Mediated Lactate Release by K⁺-Stimulated Astrocytes**. J Neuroscience. Mar 11;35(10):4168-78.

López-Fabuel I., Le Douce J., Bonvento G., James A.M., Murphy M.P., Almeida A., Bolaños J.P. **Complex I assembly into supercomplexes dictates differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes**. (Under review, PNAS)

Palombo M., Ligneul C., Najac C., Le Douce J., Flament J., Escartin C., Hantraye P., Brouillet E., Bonvento G., Valette J. **A new paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy *in vivo***. (Submitted, Nature Communications)

Le Douce J., Veran J., Faivre E., Hérard A.-S., Jegu P., Toussay X., Vanderberghe M., Balbastre Y., Delzescaux T., Hantraye P., Brouillet E., Piquet J., Tran N. T., Taverna, M., Cauli B., Olié S. H. R., Panatier A., Bonvento G. **Astrocytic 3-phosphoglycerate dehydrogenase links energy metabolism and LTP deficits in a mouse model of Alzheimer’s Disease**. (In preparation)

Publication 1: Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors.

Merienne N., Le Douce J., Faivre E., Déglon N., Bonvento G. **Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors.** Front Cell Neurosci. 2013 Jul 5;7:106.



Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors

Nicolas Merienne¹, Juliette Le Douce², Emilie Faivre², Nicole Déglon^{1*} and Gilles Bonvento^{2*}

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, Department of Clinical Neurosciences, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

² Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département des Sciences du Vivant, Institut d'Imagerie Biomédicale, Molecular Imaging Research Center and CNRS CEA URA 2210, Fontenay-aux-Roses, France

Edited by:

Carole Escartin, Molecular Imaging Research Center, France

Reviewed by:

Carole Escartin, Molecular Imaging Research Center, France
Sebastian Kügler, Universitätsmedizin Göttingen, Germany
Keith Murai, McGill University, Canada
Veerle Baekelandt, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium

*Correspondence:

Gilles Bonvento, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département des Sciences du Vivant, Institut d'Imagerie Biomédicale, Molecular Imaging Research Center and CNRS CEA URA 2210, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France
e-mail: gilles.bonvento@cea.fr
Nicole Déglon, Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, Department of Clinical Neurosciences, Lausanne University Hospital, Pavillon 3, Avenue de Beaumont, 1011 Lausanne, Switzerland
e-mail: nicole.deglon@chuv.ch

Astrocytes are now considered as key players in brain information processing because of their newly discovered roles in synapse formation and plasticity, energy metabolism and blood flow regulation. However, our understanding of astrocyte function is still fragmented compared to other brain cell types. A better appreciation of the biology of astrocytes requires the development of tools to generate animal models in which astrocyte-specific proteins and pathways can be manipulated. In addition, it is becoming increasingly evident that astrocytes are also important players in many neurological disorders. Targeted modulation of protein expression in astrocytes would be critical for the development of new therapeutic strategies. Gene transfer is valuable to target a subpopulation of cells and explore their function in experimental models. In particular, viral-mediated gene transfer provides a rapid, highly flexible and cost-effective, *in vivo* paradigm to study the impact of genes of interest during central nervous system development or in adult animals. We will review the different strategies that led to the recent development of efficient viral vectors that can be successfully used to selectively transduce astrocytes in the mammalian brain.

Keywords: viral vectors, astrocytes, CNS, tropism, gene therapy

Astrocytes make up most of the cells in the brain. In addition to well-characterized roles for astrocytes in regulating brain metabolism and blood flow, there is now an increasing body of evidence that astrocytes are dynamic regulators of synaptogenesis, synaptic function and network activity. This is conceptualized in the tripartite synapse model, where pre-synaptic and post-synaptic elements of neurons are surrounded and regulated by astrocyte processes (Araque et al., 1999; Barres, 2008).

Astrocyte maturation occurs relatively late in development after most neurogenesis has completed (Freeman, 2010). Defects in astrocyte maturation, tripartite synapse formation and plasticity during early post-natal development may be responsible for some psychiatric and neurodegenerative diseases. There is a growing body of evidence to support the view that a loss of normal astrocyte functions or a gain of abnormal effects can contribute to disease processes, and there are now numerous examples of astrocyte contributions to pathological mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington's disease (HD), and brain tumors to cite a few of them (for review see Sofroniew and Vinters, 2010).

Despite progress and potential significance, cellular, developmental, and systems-level studies of astrocytes still lag far behind

those of neurons. New sophisticated genetic tools to label and manipulate astrocytes *in vivo* were recently developed. Additional tools that allow for temporally controlled deletion of genes, specifically in rodent astrocytes, along with improved high resolution imaging techniques, are enabling researchers to address fundamental questions in astrocyte biology for the first time. However, these tools need to be more fully expanded and exploited to better understand astrocyte biology *in vivo*. The situation is complicated by the recent findings that astrocytes do not represent a homogeneous cell population across brain regions as well as within the same brain region (Zhang and Barres, 2010). So, despite evidence showing pronounced region- and layer-specific morphological heterogeneity as well as region-specific actions of astrocytes on neuronal functions, currently available tools have had limited utility for examining functional diversity among astrocytes.

To understand the role of astrocyte signaling in brain function, it is critical to study astrocytes *in situ* where their complex morphology and intimate association with neurons remains intact. Understanding neuron–glia interactions *in vivo* requires dedicated experimental approaches to manipulate each cell type independently. These approaches include targeted transgenesis and viral

transduction to overexpress or block the expression of a specific gene in astrocytes.

The past and current approaches of targeted transgenesis were recently reviewed in a comprehensive paper (Pfrieger and Slezak, 2012) and will not be detailed here.

Yet, a very important application of transgene expression is the visualization of a large population of astrocytes *in vivo* by a fluorescent protein. The use of bacterial artificial chromosomes (BACs) for the production of transgenic mice has opened new opportunities to study gene expression and functions in the brain. The resulting gene expression central nervous system (CNS) atlas program GENSAT represents a powerful resource for the scientific community (<http://www.gensat.org>). However, it remains difficult and time-consuming to target specific cell subpopulations through transgenesis, and differences in recombination efficiency between transgenic lines complicate the analysis. We will therefore rather focus on an alternative approach to genetically manipulate astrocytes that relies on the use of viral vectors. Indeed, the development of highly efficient viral vectors for gene transfer in the CNS is providing new systems for localized and controlled gene expression. Even if such approach requires the stereotaxic injection of the viral vectors in each animal, it significantly reduces the costs of *in vivo* experiments, and it can be used in combination with mouse models for conditional gene targeting, providing high flexibility and versatility to replace, modify, induce, or block expression of target genes. We will therefore review the recent development in this field that led to the emergence of effective and selective viral vectors for transducing astrocytes *in vivo*.

VIRAL VECTORS: POTENT SYSTEM FOR *IN VIVO* GENE DELIVERY IN BRAIN

Viral vectors offer the possibility to control expression of a transgene in adult or developing brain areas and can exploit the unique ability of viruses to deliver genetic material into mammalian cells. Viral vectors are derived from various viruses and are engineered to preserve the transduction efficiency while preventing the original pathogenicity and, in most cases, the capacity to multiply (Davidson and Breakefield, 2003). These viral vectors are often called multiply attenuated and replication-deficient viral vectors (Figure 1). Among the most widely used vectors for CNS applications are the lentiviral (LVs) and adeno-associated viral vectors (AAVs) which have particularly attractive properties which include, the capacity to infect non-dividing cells, the absence of cytotoxic or immune response, long-term transgene expression and large diffusion in the brain. At least for LV, the cloning capacity is sufficient to integrate most of the genes of interest (Dégion and Hantraye, 2005). Viral vectors provide a gene transfer tool that is independent of age and species considered (Kay et al., 2001; Kirik et al., 2003; Lundberg et al., 2008). Along with somatic gene transfer in developing or adult animals, viral vectors can also be used for transgenesis in species in which classical methods are not suitable, in particular large animals (Yang et al., 2008; Wongsrikeao et al., 2011).

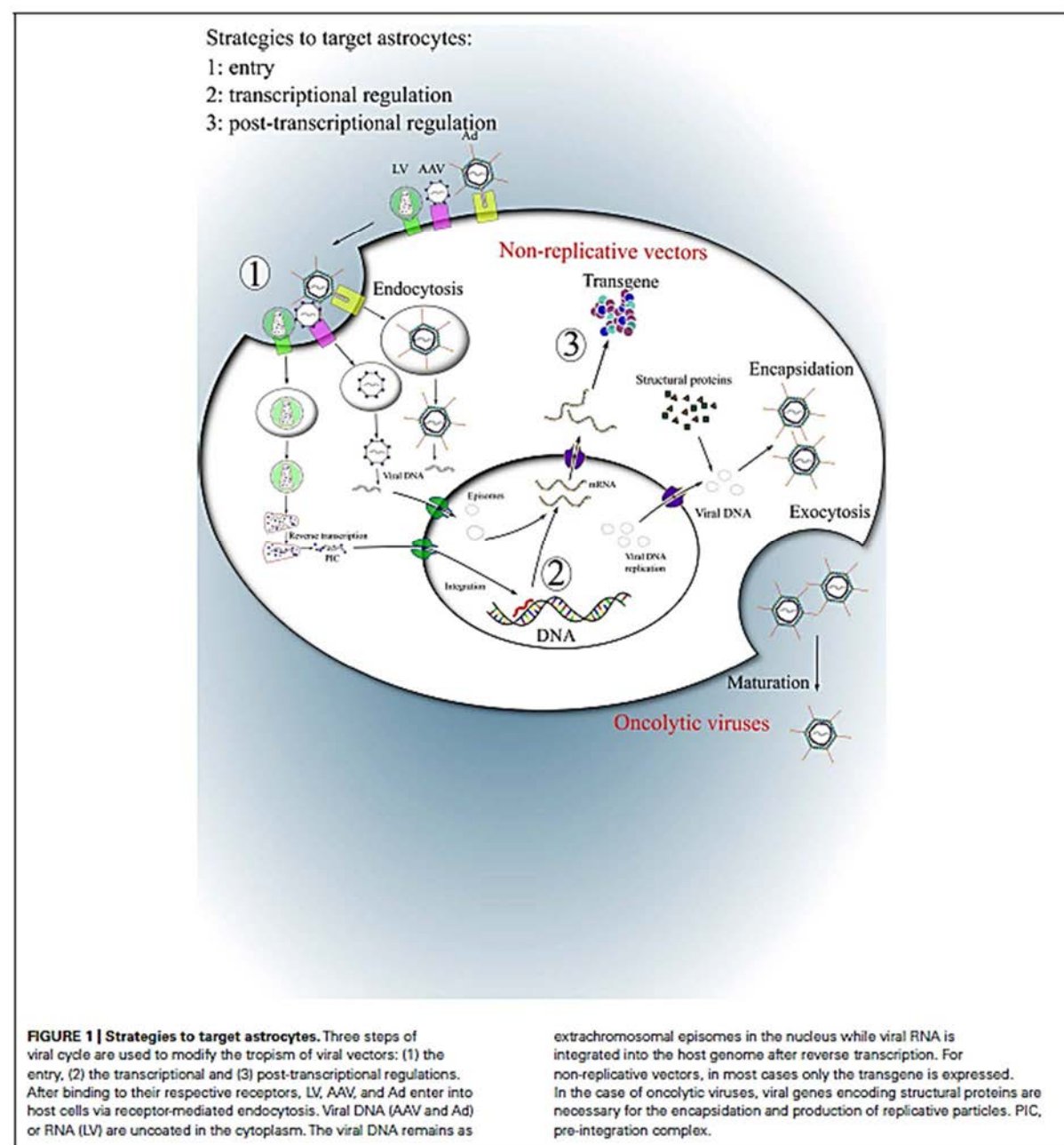
Natural viruses have a specific pattern of infection, which reflects the recognition and interaction between viral capsid/envelope and receptors expressed on susceptible cells. Similarly, the tropism of viral vectors is primarily determined by the

interaction of the viral surface proteins with receptor molecules expressed on target cells but other mechanisms could be used for subpopulation-restricted gene transfer in the brain. In particular, cell-type-specific promoters, post-transcriptional regulatory elements, replacement of retroviral envelope proteins with heterologous viral surface proteins, a phenomenon called pseudotyping (Page et al., 1990) or the use of various serotypes (AAV and Ad harboring different capsids) have been proposed to dissect and elucidate gene functions in astrocytes.

The first viral vector was obtained by exploiting the natural tropism of brain cells from the Herpes simplex virus type 1 (HSV-1; Geller and Breakefield, 1988; Federoff et al., 1992). The HSV-1 genome is complex and large, but replication-incompetent vectors, with a partial (first generation of HSV-1 vectors) or complete (amplicons) deletion of viral genes allow the insertion of very large transgenes (around 150 kb). The HSV-1 amplicons are neither pathogenic nor toxic for the infected cells and are retrogradely transported to the CNS from the peripheral nervous system (PNS; Frampton et al., 2005). These vectors have a widespread tropism for neurons (Jerusalinsky et al., 2012) and similarly to AAV and adenoviral vectors, their genetic material does not integrate into the host genome thus reducing the risk of insertional mutagenesis (Manservigi et al., 2010). However, HSV amplicons are difficult to produce, elicit low levels of adaptive immune responses and most of the human population is seropositive which limits their clinical applications for chronic disorders (Manservigi et al., 2010).

A few years after the apparition of HSV vectors, adenoviral vectors (Ad) were derived from the Ad type 5 serotype (Le Gal La Salle et al., 1993; Horellou et al., 1994). These vectors also have a high cloning capacity (approximately 30 kb of double-stranded DNA for gutless Ad) but the tropism of these vectors is not naturally oriented to the brain (Arnberg, 2012). Interestingly, a live (replication-competent Ad) vaccine has been safely administered to humans (Rubin and Rorke, 1994). This vaccine program reflects the strong immune response induced by Ad in humans (White et al., 2011), a reason why these vectors are promising candidates for tumoral therapy, and are proposed for the treatment of glioblastoma (Candolfi et al., 2006; Kroeger et al., 2010).

In the mid 1990s, the first AAV (from serotype 2) and LVs were reported (Page et al., 1990; Kaplitt et al., 1994; Naldini et al., 1996). The AAV vectors are derived from the smallest non-enveloped viruses (approximately 20 nm) and have a cloning capacity of 5 kb of single-stranded DNA. The AAV2 naturally infects humans but is non-pathogenic. It is classified as a dependovirus because it requires a co-infection with a helper virus such as Ad or HSV to perform its infectious replication cycle. The AAV persists for years in transduced cells mostly as an extrachromosomal episome (Nakai et al., 2001; Schnepf et al., 2005). To date, more than 100 serotypes of AAV have been identified, each of them possessing a specific tropism in the CNS due to the binding of the capsid with specific receptors (Wu et al., 2006a,b). Fourteen clinical trials using AAV gene transfer were performed to assess their potential therapeutic value in various neurodegenerative diseases (Crystal et al., 2004; Tuszynski et al., 2005; Kaplitt et al., 2007). In 2012, the first AAV gene therapy product was marketed by the European Medicine Agency (EMA) for the treatment of patients suffering from lipoprotein lipase deficiency (Yla-Herttuala, 2012).



Finally, the most extensively characterized LVs are derived from HIV-1, which is a subclass of retroviruses. Retroviruses are lipid-enveloped particles comprising a homodimer of linear, positive-sense, single-stranded RNA genomes of 7–11 kb. Following entry into target cells, the RNA genome is reverse-transcribed into linear double-stranded DNA and integrated into the cell chromatin (Delelis et al., 2010). To decrease the risk of insertional mutagenesis, integration-deficient LVs (IDLV) were

designed (Wanisch and Yanez-Munoz, 2009). These IDLVs are based on the use of integrase mutations that specifically prevent proviral integration, a process that results in the generation of increased levels of circular vector episomes in transduced cells. LVs were tested clinically for the treatment of adrenoleukodystrophy (ALD) and Parkinson's disease (PD). In the case of ALD, an *ex vivo* approach was used, with the transduction of hematopoietic CD34+ cells and re-infusion of corrected cells in the patients. An

immunological improvement occurred in the two treated children aged 9–12 months in combination with a blockage of the demyelinating lesions observed by magnetic resonance imaging (MRI), 12–16 months after gene therapy (Cartier et al., 2009, 2012). In a second study, a dopamine replacement strategy, with an LV that encodes the three enzymes responsible for the production of dopamine was tested in a phase I/II clinical trial. Increasing doses of LV were injected into the striatum of 15 patients with mid-stage PD. An improvement in motor function was observed at 6-months relative to pre-treatment assessment (Palfi, 2008; Jarraya et al., 2009 and see <http://www.oxfordbiomedica.co.uk>).

STRATEGIES TO TARGET ASTROCYTES

The understanding of astrocyte functions in normal and altered brain strongly relies on the availability of experimental systems to specifically target astrocytes *in vivo*. However, the first generation CNS viral vectors had a strong neurotropism *in vivo* (Naldini et al., 1996; Hermens and Verhaagen, 1997; Rabinowitz and Samulski, 1998). Indeed, the injection of AAV2 into adult rodent brains was associated with neuronal transgene expression when using ubiquitous promoters (Bartlett et al., 1998; Mandel et al., 1999; Bjorklund et al., 2000). Similarly, stereotaxic injection into rat or mouse brain of LVs pseudotyped with the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) with CMV (cytomegalovirus) or PGK (phosphoglycerate kinase 1) promoters, leads to the specific transduction of neurons with very limited transgene expression in other cell types (Naldini et al., 1996; Kordower et al., 1999; Déglon et al., 2000). Finally, the Ad5 displays a partial neurotropism with the transduction of other cell types, especially astrocytes (Smith et al., 1996; Bohn et al., 1999; Soudais et al., 2001; Rubio and Martin-Clemente, 2002; Wang et al., 2012).

However, it is important to mention that a number of parameters could alter the tropism. These include, amongst other factors, the purity of the vector, the mode of production, the site of administration, species, the developmental stage, and normal or pathophysiological conditions. Unfortunately, data gathered in primary cultures (neurons and astrocytes) are not predictive of the *in vivo* tropism and a systematic evaluation of each vector is still required. Indeed, VSV-G/LV-GFP under the control of various promoters efficiently transduces primary rat astrocytes and to a lesser extent mouse astrocytes (Englund et al., 2000; Li et al., 2010) while transgene expression is mainly restricted to neurons *in vivo* (Naldini et al., 1996; Kordower et al., 1999; Déglon et al., 2000). This phenomenon was also observed with AAV2, which efficiently targets astrocytes *in vitro* but not *in vivo* (Gong et al., 2004). The purification method has also a major impact on the tropism of AAV8. In the mouse hippocampus, the CsCl-purified AAV8-CMV-GFP displayed an astroglial pattern in contrast to the expected neuronal expression obtained with an iodixanol purification method (Klein et al., 2008). Foust et al. (2009) found that injection of AAV9-CMV early enhancer/chicken β actin promoter (CAG)-GFP into the tail vein of adult mice mainly transduces astrocytes throughout the CNS (Foust et al., 2009), whereas the tropism is mainly neuronal after intracerebral injection or intravenous injection in neonatal mice (Klein et al., 2008). Finally, discrepancies have been observed on the transduction efficiency and tropism of various AAV serotypes between species (rodent, cat,

and primates; Davidson et al., 2000; Vite et al., 2003; Burger et al., 2004; Gray et al., 2011). Additional studies are therefore still warranted to fully characterize the tropism of these vectors in the CNS. However, three strategies to direct viral vectors toward astrocytes have already been developed: shifting the tropism by favoring the entry of viruses in astrocytes, limiting transgene expression with astrocyte-specific promoters or blocking transgene expression in unwanted cells (Figure 2).

ALTERING THE ENTRY OF VIRAL VECTORS

The tropism of a virus is first determined by its binding with a specific receptor at the surface of the host cell (Lutschig et al., 2011; Arnberg, 2012). Knowledge of the structure and viral capsids or envelopes and their corresponding receptors provide essential information to specifically target individual cell types and/or diseased tissues. For example, the tropism of Ad5 vectors is regulated by the binding to its primary cellular receptor; the coxsackie and adenoviral vectors receptor (CAR). Tissues refractory to Ad5 infection do not express CAR. The limited expression of CAR in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice explains the poor transduction of these cells and transgene expression in astrocytes and other non-neuronal cells (Lewis et al., 2010). However, the expression of CAR in the nervous system and in particular in glial cells has not been extensively examined and CAR-independent forms of Ad have been developed to shift the tropism (Grellier et al., 2011).

As mentioned above, more than 100 serotypes of Ad and AAV were characterized but only a dozen of them infect cells of the CNS. Indeed, for most of them, only limited data are available concerning their receptors and their pattern of expression in the brain. The earliest and most used serotype is the AAV2, which has a natural tropism for neurons (Bartlett et al., 1998; Kugler et al., 2003). The binding of AAV2 to its primary receptor, the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) has been well-characterized, and is centered around two amino acids on the spikes of the AAV2 capsid (Kern et al., 2003; Opie et al., 2003). However, HSPG is necessary, but not wholly sufficient, for the transduction of permissive cells. In addition, fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) was identified as a co-receptor of AAV2 (Qing et al., 1999). The tropism of AAV5 *in vivo* correlated with the pattern of expression of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- α (Di Pasquale et al., 2003). The AAV1, 5, 7, 8, and 9 not only infect astrocytes *in vivo* but also neurons and other cells (Davidson et al., 2000; Wang et al., 2003; Shevtsova et al., 2005; Cearley and Wolfe, 2006; Gray et al., 2011). The AAV9 is unique compared to other AAV serotypes in that it is capable of crossing the blood-brain barrier and transducing neurons and/or astrocytes in the brain depending of the developmental stage (Foust et al., 2009). Recently, it has been shown that AAV9 uses galactose at the N-linked glycans as a receptor (Bell et al., 2011; Shen et al., 2011). The identification of the amino acids of the AAV9 capsid necessary for binding to galactose opens the possibility to modify the tropism (Bell et al., 2012). Finally, AAV4 and AAVrh43 preferentially target astrocytes (Liu et al., 2005; Lawlor et al., 2009) but the receptors for these serotypes are unknown. AAV4-RSV- β Gal and AAVrh43-CAG-eGFP exclusively transduce astrocytes when injected into the subventricular zone (SVZ) or the striatum.

However, AAVrh43-CAG-eGFP infects approximately 3 mm^3 of the striatum and 2,000 astrocytes per mm^3 while AAV8-CAG-eGFP infects 6 mm^3 of the striatum and 150,000 neurons per mm^3 (Lawlor et al., 2009).

Lentiviral vectors are increasingly being used in neuroscience research and are unique in the sense that they are enveloped viruses that can be pseudotyped (i.e., the original envelope protein can be replaced by heterologous glycoproteins). The most used pseudotype for LV is VSV-G which confers some interesting properties to the vector (Figure 2). It dramatically broadens LV tropism by facilitating transduction of various cell types in different species, it stabilizes the vector particles from shear forces during centrifugation thereby allowing vector concentration and it directs LV to an endocytic pathway, which reduces the requirements of viral accessory proteins for transduction (Cockrell and Kafri, 2007). Initial studies suggest that VSV-G/LV enters into cells using phosphatidylserine (PS), but there is no correlation between the cell surface PS levels and VSV infection or binding (Coil and Miller, 2004). In addition, competition for PS using antagonists does not block the binding of VSV on target cells. Currently, the receptors responsible for VSV-G/LV entry in cells are unknown.

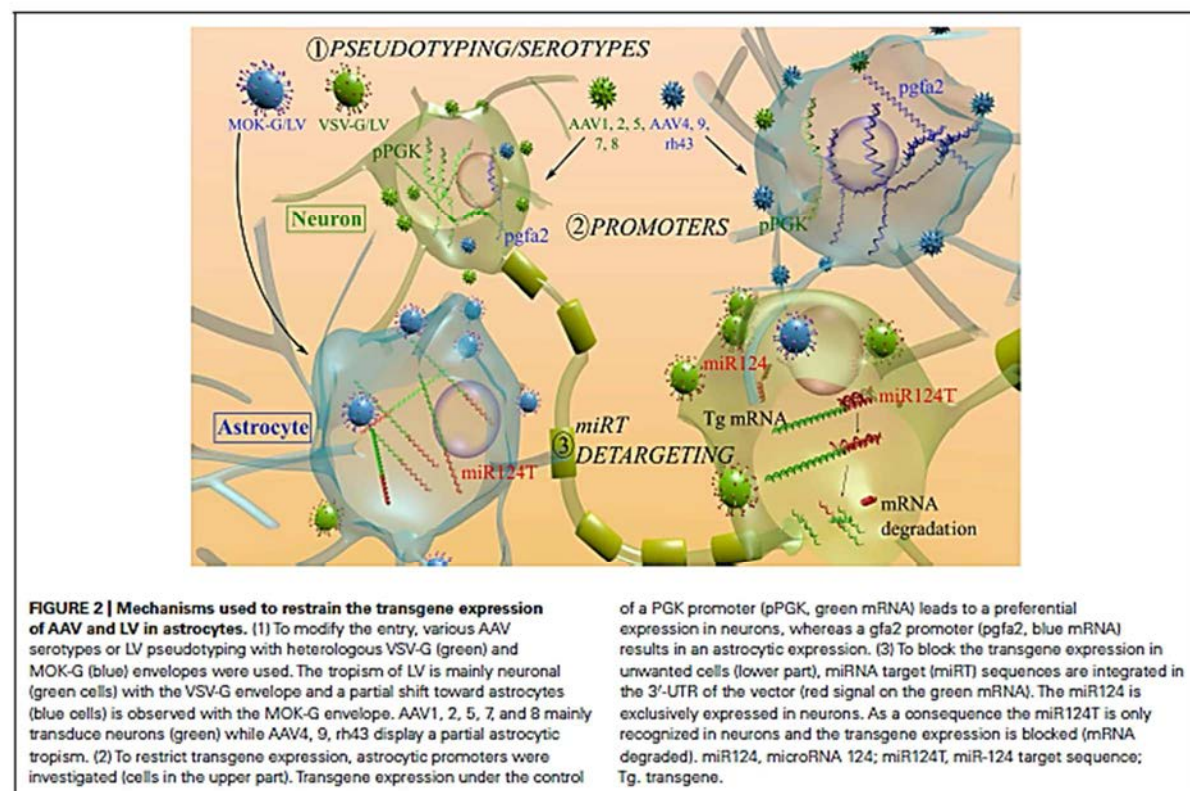
In the CNS, VSV-G/LVs expressing transgenes under the control of ubiquitous promoters have mainly a neuronal tropism with a limited transgene expression in astrocytes (Naldini et al., 1996; Déglon et al., 2000; Watson et al., 2002). Among the other envelopes used to pseudotype LVs, lymphocytic choriomeningitis

virus (LCMV) and Mokola virus (MOK) envelopes result in a partial transduction of astrocytes. *In vivo*, LV/LCMV infects specifically astrocytes in the substantia nigra and in the striatum (Miletic et al., 2004; Cannon et al., 2011). Injection of MOK/LV into the striatum or the hippocampus leads to the infection of cells that are mainly astrocytes (Pertusa et al., 2008; Colin et al., 2009). Although no quantifications were done using LCMV/LV, 70% of cells transduced by MOK/LV are astrocytes, 20% are neurons and 10% are other cell types of the striatum. In addition, it is important to note that the titers and the transduction efficiency of these latter vectors are usually lower than VSV-G/LV.

In conclusion, specific serotypes or envelopes only partially improve the astrocytic targeting of viral vectors. However, engineering chimeric capsids or envelopes targeting astrocytes is difficult and time-consuming. In order to optimize viral vectors tropism, strategies aiming at restraining transgene expression with astrocytic promoters, or by blocking expression in unwanted cells, mainly in neurons, were developed.

TARGETING ASTROCYTES WITH TRANSCRIPTION REGULATORY ELEMENTS

Different astrocytic promoters have been used to restrict transgene expression into glial cells. However, the packaging size of each viral vector limits the type of promoters which can be inserted. Analysis of the transcriptional regulatory elements of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter reveals that 5'-flanking regions



of the gene are sufficient to direct transgene expression in astrocytes (Brenner et al., 1994). Two fragments compatible with AAV and LV vectors were created: gfa2 of 2.2 kb and gfaABC1D of 600 bp (Brenner et al., 1994; Lee et al., 2008). The cloning of the gfa2 fragment into Ad5 and AAVrh43 vectors restricts transgene expression in rat astrocytes (Do Thi et al., 2004; Lawlor et al., 2009; Mamber et al., 2010; Arregui et al., 2011). However, no quantification was performed to determine the number of transduced astrocytes. In the study by Lawlor et al. (2009), the gfa2 promoter was cloned into the AAV8 vector. The Gfa2-AAV8 vector infects mainly astrocytes in the striatum but a low transgene expression was still observed in neurons. The authors indicated that AAV8-gfa2-eGFP has high transduction efficiency with a wide diffusion in the striatum while AAVrh43-gfa2-eGFP transduces only a limited number of cells. It was shown recently that injection of high titer of AAV5-gfa2-eGFP into the striatum or the substantia nigra provides an astrocyte-specific expression with no residual expression into neurons or microglial cells. In addition, the expression was stable until 12 weeks post-injection. Stereological analysis of transgene expression reveals that a mean of 15,000 astrocytes per mm³ of striatal tissue were transduced (Drinkut et al., 2012), corresponding to ~75% of the astrocytes present in the transduced area (Savchenko et al., 2000).

Astrocytic promoters were also used in combination with LCMV and MOK pseudotyped LVs (Figure 2). The vector LCMV/LV-gfa2-Cre was injected into the SVZ of Rosa26 mice that express the sequence LoxP-stop-LoxP-LacZ (Stein et al., 2005). The expression of Cre in transduced cells removes the STOP cassette in Rosa26 mice and as a consequence, LacZ staining was observed in astrocytes of the SVZ after LCMV/LV injection. However, no quantification was performed although some neurons expressed the transgene. To develop an expression system activated in pathological conditions, Jakobsson et al. (2004) took advantage of GFAP up-regulation in reactive astrocytes. Using toxin-induced lesion models (6-hydroxy-dopamine and ibotenic acid lesions), they showed that the transgene expression is eight-fold higher in reactive astrocytes: a finding which correlates with the activity of the endogenous GFAP gene (Jakobsson et al., 2004). Recently, other astrocytic promoters were used in LV vectors, such as the glutamate transporter promoter, EAAT1 (Colin et al., 2009). In this study, striatal injection of MOK/LV-EAAT1-GFP leads to the expression of the transgene mainly in astrocytes (75% of the transduced cells).

In conclusion, astrocyte-specific promoters alone or in combination with an "astrocytic" capsids or envelopes, significantly shift the tropism of viral vectors toward astrocytes *in vivo*. However, the targeting is, in most cases, not complete and a residual transduction (10–40%) of non-astrocytic cells is observed. In addition, most studies rely on the use of the GFAP promoter. Large initiatives are underway to characterize the regulatory elements of the whole human genome (Gerstein et al., 2012; Whitfield et al., 2012) and new astrocyte-specific promoters were recently described. For example, the aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 (ALDH1L1) promoter is highly active in all mature astrocytes (Cahoy et al., 2008) while the GLAST promoter was used to express transgene in GFAP-positive but also GFAP-negative astrocytes (Liu et al., 2006; Regan et al., 2007; Buffo et al., 2008). Analysis of

GLAST and GLT1-GFP mice has revealed an unexpected non-overlapping pattern between the two transporters and confirmed the differential activation of the promoters during embryogenesis and in adulthood. GLAST activity was low in the forebrain and high in the cerebellum, whereas GLT1 expression was higher in the cortex than in the cerebellum, consistent with the prominent role of GLT1 in glutamate uptake in the forebrain. Combining data from the ENCODE project and the gene expression cartography in human and mouse brain will provide additional and essential information to identify minimal fragments necessary for cell-type-specific transgene expression in viral vectors (Hawrylycz et al., 2012). This strategy has already been developed by the Pleiade Project, which integrated information from genomic databases to construct synthetic MiniPromoters for viral vectors containing only the indispensable regulatory elements to achieve gene expression (Portales-Casamar et al., 2010).

DETARGETING STRATEGY USING MICRORNA

To further improve viral vector tropism, post-transcriptional regulatory elements have been integrated into viral vectors to block transgene expression in non-targeted cells. This strategy called "detargeting" uses microRNA (miRNA) machinery to obtain tissue-specific expression (Brown et al., 2007; Figure 2). miRNAs are small non-coding RNA of 19–25 nucleotides that mediates post-transcriptional gene suppression (Bartel and Chen, 2004; O'Carroll and Schaefer, 2013). Approximately 1,000 miRNAs have been identified and almost 50% of them are expressed in mammalian brains (He et al., 2012). These miRNA are differentially distributed in distinct brain regions and show cell-type specificity with even differential intraneuronal miRNA compartmentalization (Bak et al., 2008; Edbauer et al., 2010). Since miRNAs target most genes, they represent important regulators of expression and are implicated in a large range of biological activities. The negative regulation of gene expression is mediated through base-pairing with complementary regions within the 3' untranslated region (3'-UTR) of their target protein-coding messenger RNAs (mRNAs; Bartel and Chen, 2004; Kosik, 2006; Saugstad, 2010). To restrict transgene expression in a specific cell population, a miRNA present in unwanted cells but not expressed in targeted cells is chosen. A natural target sequence (miRT) or a sequence fully complementary to the mature miRNA is cloned in the 3'-UTR of the gene of interest (Brown et al., 2007). This detargeting strategy was first demonstrated in the CNS with the neuron-specific miR124 (Colin et al., 2009). In this latter study, four copies of the natural target sequence of miR124 from the integrin- β 1 gene were inserted in a LV to block transgene expression in neurons. When a miRT with a partial complementarity (bulged miRT) to its miRNA is placed in 3'-UTR of a gene of interest, repression occurs both at post-transcriptional (mRNA degradation) and translational levels. Whereas, in the case of a synthetic miRT with full complementarity with the miRNA, mRNA degradation is the main mechanism of action (Gentner and Naldini, 2012). Importantly, no saturation of miRNA machinery or adverse biological effects was reported with these miRNA-regulated LV (Colin et al., 2009; Gentner et al., 2009). The miRT threshold for saturation varies for each miRNA, perfectly complementary miRTs have a lower risk to saturate the miRNA machinery. In

addition, each miRNA has differential suppressive activity ranging from 5 up to >150-fold (Gentner et al., 2009). In this context, miR124 is a promising candidate because it is highly expressed in neurons (Lagos-Quintana et al., 2002; Smirnova et al., 2005; Deo et al., 2006). The insertion of four miR124T sequence in a VSV-G pseudotyped LV (VSV/LV-PGK-LacZ-miR124T) significantly decreases transgene expression levels and the number of β -galactosidase-positive neurons in the striatum of adult mice (Colin et al., 2009). This detargeting approach was used to shift the tropism of LV toward astrocytes. Double-immunofluorescence staining with neuronal and astrocytic markers demonstrated that combining mokola pseudotyping and miR124T (MOK/LV-PGK-LacZ-miR124T) resulted in a transgene expression that was almost exclusively restricted to astrocytes, with $89 \pm 3\%$ β -galactosidase-S100 β -positive cells and $6 \pm 4\%$ NeuN-positive cells. This effect was not restricted to the striatum as similar results were obtained in the hippocampus and cerebellum.

In conclusion, the use of these three different strategies (modulation of viral vector entry, transcription and post-transcriptional regulations) has enabled the development of efficient gene transfer systems to specifically target astrocytes (Figure 3). Thanks to the unique features of these new viral vectors, it has already been possible to make significant advances in two areas of research related to the development of innovative therapies and the modeling of neurological disorders.

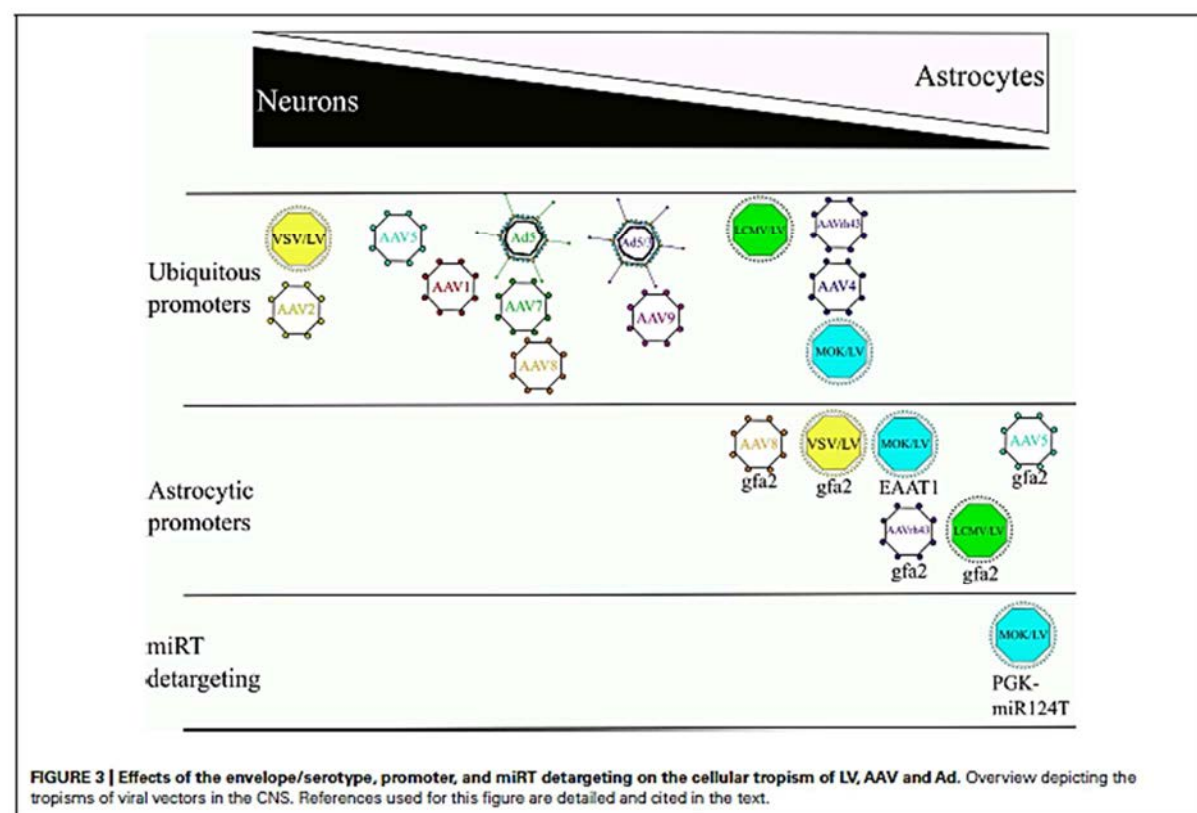
VIRAL VECTORS TARGETING ASTROCYTES: APPLICATIONS FOR BRAIN DISEASES

MODELING BRAIN DISEASES

There is evidence to support the idea that the mechanisms responsible for selective neurodegeneration in some brain disorders are non-cell autonomous and based upon pathological cell-cell interactions. The selective death of the neuronal population at risk in each disorder can be better explained by the convergence of multiple pathogenic mechanisms which provoke damage within the vulnerable neuron and neighboring cell types rather than by autonomous cell mechanisms (Ilieva et al., 2009).

In order to dissect out the specific role of different cell populations *in vivo* (neurons, astrocytes, microglia), two different strategies were recently used. The first one relies on the use of the Cre/loxP system to silence the expression of the mutant protein in specific cell types by crossing different Cre-expressing transgenic mice with transgenic mice expressing the mutant protein flanked by loxP sites in all cell types. The opposite strategy consists of selectively expressing the mutant protein in specific cell types using either specific promoters such as GFAP or by crossing different Cre-expressing transgenic mice with transgenic mice expressing the mutant protein after a STOP cassette flanked by loxP sites.

These two strategies were useful in providing evidence that astrocytes play a key role in the pathogenesis of ALS (Ilieva et al.,



2009), spinocerebellar ataxia 7 (Custer et al., 2006), HD (Gu et al., 2005; Bradford et al., 2009, 2010), and tauopathies (Forman et al., 2005; Dabir et al., 2006). However, an alternative strategy based upon the use of viral vectors to selectively and locally express the mutant protein has also proven to be very useful and complementary to the development of transgenic mice in particular to test whether a local expression is sufficient to induce pathological mechanisms. Through the use of a newly developed LV (Colin et al., 2009), a short form of the mutant protein huntingtin (mHtt, responsible for HD), was expressed only in striatal astrocytes and not in neurons (Faideau et al., 2010). It has been shown that these glial cells developed a progressive phenotype of reactive astrocytes that was characterized by a marked decreased expression of both glutamate transporters, GLAST and GLT-1, and of glutamate uptake. This reactive phenotype was associated with neuronal dysfunction, as observed by a reduction in DARPP-32 and NR2B expression. Consistent with the above findings, a histological re-evaluation of potential astrocyte reactivity within postmortem brains of HD patients showed the presence of astrogliosis in the caudate nucleus of Grade 0 patients and confirmed the colocalization of mHtt in astrocytes with a grade-dependent reduction in GLT-1. Through the use of viral vectors that target astrocytes locally, we were able to show that the presence of mHtt in astrocytes is sufficient to alter the glial glutamate transport capacity early in the disease process and may contribute to pathogenesis of HD.

GLIOBLASTOMA MULTIFORM

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common primary tumor developing in the brain from astrocytes. Due to the quick proliferation and its infiltrative nature, complete ablation by surgery is almost impossible. The prognosis is very poor, with a median survival of 14.6–19.6 months and an inevitable relapse within a few months after the resection (Grossman et al., 2010). Viral-mediated gene therapy aiming to reduce glial proliferation represents, therefore, an alternative therapy (Murphy and Rabkin, 2013). Indeed, GBM is a good candidate for gene therapy because tumor cells rarely develop metastasis outside of the brain and most cells in the CNS are post-mitotic, reducing side effects of therapeutic strategies targeting dividing cells.

However, appropriate viral vectors for the treatment of GBM are different from those developed for the treatment of neurodegenerative diseases. For GBM therapy, the aim is to mediate destruction of proliferating cells. Glial targeting is achieved either by the injection of the vector into the tumor mass, by choosing a vector which target dividing cells or having a partial tropism for glial cells, as it is the case for Ad (Asadi-Moghaddam and Chiocca, 2009).

The first studies used a replication-deficient mouse moloney leukemia virus (MLV) that infected dividing cells and expressed a suicide gene (thymidine kinase, TK; Ram et al., 1993). Thymidine kinase is a phosphotransferase enzyme that incorporates dGTP analogs in the presence of ganciclovir instead of cellular dGTP and leads to the blockade of cellular replication (Boivin et al., 1993). But the low transduction efficiency neither improved tumor progression nor the overall survival time (Ram et al., 1993, 1994; Gunzburg et al., 1995). To improve the efficacy of the treatment, vector-producing cells (VPC releasing MLV particles expressing

the TK suicide gene) were injected into the brain after surgical resection of the tumor. However, no significant decrease of tumor mass occurred despite the bystander effect (Ram et al., 1997; Klatzmann et al., 1998; Shand et al., 1999; Packer et al., 2000; Rainov, 2000; Martinet et al., 2003). As an alternative therapy, Ad-TK was administered directly to GBM patients but the phase III trial showed no positive outcome (Cottin et al., 2011). Interestingly, it was shown that the preferential transduction of glioma cells is not dependent on the expression of known Ad receptors on tumor cells (Candolfi et al., 2006). Expressing the therapeutic suicide gene under the control of a strong ubiquitous promoter in combination with an immune stimulator may increase therapeutic efficacy and prevent relapse (Candolfi et al., 2006; Ghulam Muhammad et al., 2009).

As an alternative strategy to improve the therapeutic efficacy, conditionally replicative or replicative viruses were developed. The principle of oncolytic therapy is to inject directly into the tumoral cells a lytic replicative-competent cytotoxic virus, such as HSV, VSV, Ad, or retroviruses, which will induce apoptosis in proliferative cells during replication (Parker et al., 2009; Zemp et al., 2010; Castro et al., 2011; Russell et al., 2012). HSV were initially used as lytic viruses in GBM therapy (Zemp et al., 2010). However, the high worldwide HSV seropositivity limits their use in the clinic and as a consequence has led to the development of other oncolytic viruses. A deletion of E1B region on Ad genome (Ad-ONYX-15) was introduced to favor apoptosis in infected glioma cells but the efficiency of this approach was too low to reach a phase II of clinical trial (Moran, 1993; Chiocca et al., 2004). In addition, replicative adenoviral vectors expressing therapeutic genes were used to mediate tumoral cells destruction. The candidate genes are inserted in the E3 deleted region and a CAR-independent entry mechanism enhancing the transduction efficiency of tumoral cells has been proposed for these new generation oncolytic viruses. To favor replication in GFAP-positive cells, three copies of glial specific B enhancer were added on the gfa2 promoter (gfa2B3), leading to a decreased growth of glioma cells (Horst et al., 2007).

GENE THERAPY FOR NEURODEGENERATIVE DISORDERS

Degeneration of the nigro-striatal projection represents the major pathological hallmark of PD. Preclinical rodent and non-human primate models demonstrated a strong protective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the nigro-striatal dopaminergic system (Gash et al., 1996; Kirik et al., 2000). However, intrathecal infusion of GDNF protein or viral vector-mediated expression of neurturin in the striatum of late stage PD patients showed no significant clinical benefit (Lang et al., 2006; Marks et al., 2010). Current gene therapeutic trials in the brain predominantly use AAV2 due to its proven safety record. In the animal and human CNS, AAV2 predominately transduces neurons. However, the expression of neurotrophic factors in neurons may impose a serious safety issue since the factors can be secreted from the soma, unmyelinated projections, or synaptic sites of transduced neurons, thereby delivering a complex signaling-inducing molecule to potential off-target sites. One alternative strategy would be to restrict their impact to the immediate vicinity of the site of the lesion. Through the use of an AAV5 expressing

GDNF under the expression of GFAP, Drinkut et al. (2012) demonstrated the same efficacy as neuron-derived GDNF. In terms of safety, unilateral striatal GDNF expression in astrocytes did not result in delivery of bio-active GDNF to the contralateral hemispheres (potential off-target sites) as was the case when GDNF was expressed in neurons. This suggests that astrocytic neurotrophic factor expression achieved by a viral vector can be considered an efficient alternative to current gene therapeutic strategies.

Astrocyte activation, characterized by hypertrophic somata and processes, is an early hallmark in most neurodegenerative conditions. The functional impact of this activation on the progression of these diseases is still elusive and their therapeutic potential is yet unexploited. A recent study has taken advantage of the strong astrocytic tropism of AAV2/5 expressing the astrocyte-specific promoter Gfa2 to test the potential of astrocyte-targeted therapeutics in an intact animal model of Alzheimer's disease (AD; Furman et al., 2012). It was shown that the bilateral administration of AAV2/5 Gfa2-VIVIT (a synthetic peptide that blocks the calcineurin (CN)/nuclear factor of activated T cells (NFAT) pathway which regulates several components of the activated astrocyte phenotype) into the hippocampus of 7- to 8-month-old APP/PS1 mice, was associated with reduced glial activation, lower amyloid levels, improved synaptic plasticity, and an improved cognitive function at 16–17 months of age. This result represents a proof-of-principle that astrocytes can be considered as significant therapeutic targets not only in AD but also for other neurodegenerative diseases. Because of its specificity, lack of toxicity and capacity for widespread and long-lasting transgene expression, AAV appears to be an ideal vehicle for directing therapeutics to astrocytes.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The growing importance of astrocytes in crucial brain functions and also dysfunctions has led to the development of new genetic tools to label and manipulate these glial cells *in vivo*. Thanks to these tools that include targeted transgenesis and viral transduction, considerable advances were made in the understanding of astroglial biology. This first generation of astrocytic viral vectors was instrumental to start depicting their role in specific brain regions of different species. However, a better determination of the numerous functions played by astrocytes during development, in adulthood and disease will require new viral vectors that can further resolve the intimate relationship between neurons and glia in the maturing brain (Molofsky et al., 2012). One important

issue relates to the recent but well-accepted notion that astrocytes do not represent a homogenous population of cells. This is, of course, thoroughly demonstrated for neurons (Miller and Gauthier, 2007) but is just starting to be studied for astrocytes in particular because of the lack of reliable markers to follow these different cell populations. The launching of recent initiatives such as the Human Brain Project and ENCODE will increase our knowledge on the functions of astrocytes and may help to refine strategies previously developed to drive transgene expression into specialized astrocytes at different stages of development either in normal or diseased states. A comprehensive mapping of the cell-type-specific expression of miRNAs, the development and *in vivo* assessment of efficient miRT sequences will also permit one to ameliorate the detargeting strategy. Similarly, the identification of the receptors required for the binding of the viral particles to astrocyte subpopulations will represent a major step toward the production of more efficient astrocytic viral vectors. In addition to these strategies which are already used to drive the tropism of viral vectors toward astrocytes, new viral vectors could be developed. Among these emerging viral vectors, baculoviral vectors take advantage of their natural tropism for astrocytes (Boulaire et al., 2009). Their large genome size (140 kb) is suitable for the incorporation of large genes of interest and complex regulatory elements (Wang and Wang, 2006). Clinical observations in patients suffering from neurological pathologies following viral infections suggest that other viruses could have a cerebrotropism (e.g., alphaviruses or arboviruses; Das et al., 2010; Walker et al., 2012). This illustrates the need for multidisciplinary programs that would share the expertise of neurobiologists, virologists, geneticists, and clinicians in order to overcome the limitations of current vectors and discover innovative gene transfer systems. Considering how much more might be discovered about the functions of normal or diseased astrocytes, it is tempting to suggest that we are just at the beginning of the development of astrocytic viral vectors.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Agence National de la Recherche (ANR 2011 MALZ 003 02), Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (Irtelis PhD International Program for Juliette Le Douce), Centre National de la Recherche Scientifique, and Swiss National Science Foundation 31003A-140945. The authors gratefully acknowledge Dr. Alan R. Young for careful editing of the manuscript.

REFERENCES

- 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)00139-6
- Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 442–448. doi: 10.1016/j.tips.2012.04.005
- Arregui, L., Benitez, J. A., Razgado, L. F., Vergara, P., and Segovia, J. (2011). Adenoviral astrocyte-specific expression of BDNF in the striata of mice transgenic for Huntington's disease delays the onset of the motor phenotype. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 1229–1243. doi: 10.1007/s10571-011-9725-y
- Asadi-Moghaddam, K., and Chiocca, E. A. (2009). Gene- and viral-based therapies for brain tumors. *Neurotherapeutics* 6, 547–557. doi: 10.1016/j.nurt.2009.04.007
- Bak, M., Silahatoglu, A., Moller, M., Christensen, M., Rath, M. F., Skryabin, B., et al. (2008). MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* 14, 432–444. doi: 10.1261/rna.783108
- Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430–440. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.013
- Bartel, D. P., and Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 5, 396–400. doi: 10.1038/nrg1328
- Bartlett, J. S., Samulski, R. J., and McCown, T. J. (1998). Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum. Gene Ther.* 9, 1181–1186. doi: 10.1089/hum.1998.9.8-1181
- Bell, C. L., Gurda, B. L., Van Vliet, K., Agbandje-Mckenna, M., and Wilson, J. M. (2012). Identification of the galactose binding domain of the adeno-associated virus serotype 9

- capsid. *J. Virol.* 86, 7326–7333. doi: 10.1128/JVI.00448-12
- Bell, C. L., Vandenberghe, L. H., Bell, P., Limberis, M. P., Gao, G. P., Van Vliet, K., et al. (2011). The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 2427–2435. doi: 10.1172/JCI57367
- Bjorklund, A., Kirik, D., Rosenblad, C., Georgievskaya, B., Lundberg, C., and Mandel, R. J. (2000). Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 886, 82–98. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02915-2
- Bohn, M. C., Choi-Lundberg, D. L., Davidson, B. L., Leranth, C., Kozlowski, D. A., Smith, J. C., et al. (1999). Adenovirus-mediated transgene expression in nonhuman primate brain. *Hum. Gene Ther.* 10, 1175–1184. doi: 10.1089/10430349900018166
- Boivin, G., Erice, A., Crane, D. D., Dunn, D. L., and Balfour, H. H. Jr. (1993). Acyclovir susceptibilities of herpes simplex virus strains isolated from solid organ transplant recipients after acyclovir or ganciclovir prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 357–359. doi: 10.1128/AAC.37.2.357
- Boulaire, J., Zhao, Y., and Wang, S. (2009). Gene expression profiling to define host response to baculoviral transduction in the brain. *J. Neurochem.* 109, 1203–1214. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06015.x
- Bradford, J., Shin, J. Y., Roberts, M., Wang, C. E., Li, X. J., and Li, S. (2009). Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 22480–22485. doi: 10.1073/pnas.0911503106
- Bradford, J., Shin, J. Y., Roberts, M., Wang, C. E., Sheng, G., Li, S., et al. (2010). Mutant huntingtin in glial cells exacerbates neurological symptoms of Huntington disease mice. *J. Biol. Chem.* 285, 10653–10661. doi: 10.1074/jbc.M109.083287
- Brenner, M., Kisseberth, W. C., Su, Y., Besnard, F., and Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci.* 14, 1030–1037.
- Brown, B. D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., et al. (2007). Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat. Biotechnol.* 25, 1457–1467. doi: 10.1038/nbt1372
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A. P., et al. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3581–3586. doi: 10.1073/pnas.0709021105
- Burger, C., Gorbatyuk, O. S., Velardo, M. J., Peden, C. S., Williams, P., Zolotukhin, S., et al. (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.* 10, 302–317. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.05.024
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28, 264–278. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008
- Candolfi, M., Curtin, J. F., Xiong, W. D., Kroeger, K. M., Liu, C., Rentsendorj, A., et al. (2006). Effective high-capacity gutless adenoviral vectors mediate transgene expression in human glioma cells. *Mol. Ther.* 14, 371–381. doi: 10.1016/j.ymthe.2006.05.006
- Cannon, J. R., Sew, T., Montero, L., Burton, E. A., and Greenamyre, J. T. (2011). Pseudotype-dependent lentiviral transduction of astrocytes or neurons in the rat substantia nigra. *Exp. Neurol.* 228, 41–52. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.10.016
- Cartier, N., Hache-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Bougneres, P., Schmidt, M., Kalle, C. V., et al. (2012). Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol.* 507, 187–198. doi: 10.1016/B978-0-12-386509-0.00010-7
- Cartier, N., Hache-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., et al. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818–823. doi: 10.1126/science.1171242
- Castro, M. G., Candolfi, M., Kroeger, K., King, G. D., Curtin, J. F., Yagiz, K., et al. (2011). Gene therapy and targeted toxins for glioma. *Curr. Gene Ther.* 11, 155–180. doi: 10.2174/156652311795684722
- Cearley, C. N., and Wolfe, J. H. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 13, 528–537. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.11.015
- Chiocia, E. A., Abbed, K. M., Tatter, S., Louis, D. N., Hochberg, F. H., Barker, F., et al. (2004). A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol. Ther.* 10, 958–966. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.021
- Cockrell, A. S., and Kafri, T. (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 36, 184–204. doi: 10.1007/s12033-007-0010-8
- Coil, D. A., and Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 78, 10920–10926. doi: 10.1128/JVI.78.20.10920-10926.2004
- Colin, A., Faideau, M., Dufour, N., Auregan, G., Hassig, R., Andrieu, T., et al. (2009). Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia* 57, 667–679. doi: 10.1002/glia.20795
- Cottin, S., Gould, P. V., Cantin, L., and Caruso, M. (2011). Gap junctions in human glioblastomas: implications for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 18, 674–681. doi: 10.1038/cgt.2011.38
- Crystal, R. G., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kaminsky, S. M., Worgall, S., Stieg, P., et al. (2004). Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum. Gene Ther.* 15, 1131–1154. DOI:10.1089/hum.2004.15.1131
- Custer, S. K., Garden, G. A., Gill, N., Rueb, U., Libby, R. T., Schultz, C., et al. (2006). Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat. Neurosci.* 9, 1302–1311. doi: 10.1038/nn1750
- Dabir, D. V., Robinson, M. B., Swanson, E., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., et al. (2006). Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J. Neurosci.* 26, 644–654. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3861-05.2006
- Das, T., Jaffar-Bandjee, M. C., Hoarau, J. J., Krejbich Trotot, P., Denizot, M., Lee-Pat-Yuen, G., et al. (2010). Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. *Prog. Neurobiol.* 91, 121–129. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.12.006
- Davidson, B. L., and Breakefield, X. O. (2003). Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 353–364. doi: 10.1038/nrn1104
- Davidson, B. L., Stein, C. S., Heth, J. A., Martins, I., Kotin, R. M., Derksen, T. A., et al. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3428–3432. doi: 10.1073/pnas.97.7.3428
- Déglon, N., and Hantraye, P. (2005). Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *J. Gene Med.* 7, 530–539.
- Déglon, N., Tseng, J. L., Bensadoun, J. C., Zurn, A. D., Arsenijevic, Y., Pereira De Almeida, L., et al. (2000). Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 11, 179–190.
- Delelis, O., Zamborlini, A., Thierry, S., and Saib, A. (2010). Chromosomal tethering and proviral integration. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 207–216. doi: 10.1016/j.bbaggm.2009.08.005
- Deo, M., Yu, J. Y., Chung, K. H., Tippens, M., and Turner, D. L. (2006). Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Dev. Dyn.* 235, 2538–2548. doi: 10.1002/dvdy.20847
- Di Pasquale, G., Davidson, B. L., Stein, C. S., Martins, I., Scudiero, D., Monks, A., et al. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat. Med.* 9, 1306–1312. doi: 10.1038/nm929
- Do Thi, N. A., Saillour, P., Ferrero, L., Dedieu, J. F., Mallet, J., and Paunio, T. (2004). Delivery of GDNF by an E1/E3/E4 deleted adenoviral vector and driven by a GFAP promoter prevents dopaminergic neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther.* 11, 746–756. doi: 10.1038/sj.gt.3302222
- Drinkut, A., Tereshchenko, Y., Schulz, J. B., Bahr, M., and Kugler, S. (2012). Efficient gene therapy for Parkinson's disease using astrocytes as hosts for localized neurotrophic factor delivery. *Mol. Ther.* 20, 534–543. doi: 10.1038/mt.2011.249
- Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C. F., Seeburg, D.

- P., Batterton, M. N., et al. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65, 373–384. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.005
- Englund, U., Ericson, C., Rosenblad, C., Mandel, R. J., Trono, D., Wictorin, K., et al. (2000). The use of a recombinant lentiviral vector for ex vivo gene transfer into the rat CNS. *Neuroreport* 11, 3973–3977. doi: 10.1097/00001756-200012180-00014
- Faudeau, M., Kim, J. H., Cormier, K., Gilmore, R., Welch, M., Aregan, G., et al. (2010). In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3053–3067. doi: 10.1093/hmg/ddq212
- Federoff, H. J., Geschwind, M. D., Geller, A. I., and Kessler, J. A. (1992). Expression of nerve growth factor in vivo from a defective herpes simplex virus 1 vector prevents effects of axotomy on sympathetic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1636–1640. doi: 10.1073/pnas.89.5.1636
- Forman, M. S., Lal, D., Zhang, B., Dabir, D. V., Swanson, E., Lee, V. M., et al. (2005). Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J. Neurosci.* 25, 3539–3550. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0081-05.2005
- Foust, K. D., Nurre, E., Montgomery, C. L., Hernandez, A., Chan, C. M., and Kaspar, B. K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* 27, 59–65. doi: 10.1038/nbt.1515
- Frampton, A. R. Jr., Goins, W. F., Nakano, K., Burton, E. A., and Glorioso, J. C. (2005). HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. *Gene Ther.* 12, 891–901. doi: 10.1038/sj.gt.3302545
- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330, 774–778. doi: 10.1126/science.1190928
- Furman, J. L., Sama, D. M., Gant, J. C., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Bachstetter, A. D., et al. (2012). Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 32, 16129–16140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012
- Gash, D. M., Zhang, Z. M., Ovadia, A., Cass, W. A., Yi, A., Simmerman, L., et al. (1996). Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380, 252–255. doi: 10.1038/380252a0
- Geller, A. I., and Breakefield, X. O. (1988). A defective HSV-1 vector expresses *Escherichia coli* beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science* 241, 1667–1669. doi: 10.1126/science.2843986
- Gentner, B., and Naldini, L. (2012). Exploiting microRNA regulation for genetic engineering. *Tissue Antigens* 80, 393–403. doi: 10.1111/tan.12002
- Gentner, B., Schira, G., Giustacchini, A., Amendola, M., Brown, B. D., Ponzoni, M., et al. (2009). Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat. Methods* 6, 63–66. doi: 10.1038/nmeth.1277
- Gerstein, M. B., Kandaje, A., Hariharan, M., Landt, S. G., Yan, K. K., Cheng, C., et al. (2012). Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* 489, 91–100. doi: 10.1038/nature11245
- Ghulam Muhammad, A. K., Candelieri, M., King, G. D., Yazig, K., Foulad, D., Mineharu, Y., et al. (2009). Antiglioma immunological memory in response to conditional cytotoxic/immune-stimulatory gene therapy: humoral and cellular immunity lead to tumor regression. *Clin. Cancer Res.* 15, 6113–6127. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1087
- Gong, Y., Chen, S., Sonntag, C. F., Summers, C., Klein, R. L., King, M. A., et al. (2004). Recombinant adeno-associated virus serotype 2 effectively transduces primary rat brain astrocytes and microglia. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 14, 18–24. doi: 10.1016/j.brainresprot.2004.08.001
- Gray, S. J., Matagne, V., Bachaboina, L., Yadav, S., Ojeda, S. R., and Samulski, R. J. (2011). Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol. Ther.* 19, 1058–1069. doi: 10.1038/mt.2011.72
- Grellier, E., Lecolle, K., Rogee, S., Couturier, C., D'Halluin, J. C., Hong, S. S., et al. (2011). A fiber-modified adenoviral vector interacts with immunoevasion molecules of the B7 family at the surface of murine leukemia cells derived from dormant tumors. *Mol. Cancer* 10, 105. doi: 10.1186/1476-4598-10-105
- Grossman, S. A., Ye, X., Piantadosi, S., Desideri, S., Nabors, L. B., Rosenfeld, M., et al. (2010). Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin. Cancer Res.* 16, 2443–2449. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3106
- Gu, X., Li, C., Wei, W., Lo, V., Gong, S., Li, S. H., et al. (2005). Pathological cell-cell interactions elicited by a neuropathogenic form of mutant Huntingtin contribute to cortical pathogenesis in HD mice. *Neuron* 46, 433–444. doi: 10.1016/j.neuron.2005.03.025
- Gunzburg, W. H., Saller, R. M., and Salmons, B. (1995). Retroviral vectors directed to predefined cell types for gene therapy. *Biologicals* 23, 5–12. doi: 10.1016/1045-1056(95)90003-9
- Hawrylycz, M. J., Levin, E. S., Guillozet-Bongaarts, A. L., Shen, E. H., Ng, L., Miller, J. A., et al. (2012). An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 489, 391–399. doi: 10.1038/nature11405
- He, M., Liu, Y., Wang, X., Zhang, M. Q., Hannon, G. J., and Huang, Z. J. (2012). Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain. *Neuron* 73, 35–48. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.010
- Hermens, W. T., and Verhaagen, J. (1997). Adenoviral vector-mediated gene expression in the nervous system of immunocompetent Wistar and T cell-deficient nude rats: preferential survival of transduced astroglial cells in nude rats. *Hum. Gene Ther.* 8, 1049–1063. doi: 10.1089/hum.1997.8.9-1049
- Horellou, P., Vigne, E., Castel, M. N., Barneoud, P., Colin, P., Perricaudet, M., et al. (1994). Direct intracerebral gene transfer of an adenoviral vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 6, 49–53. doi: 10.1097/00001756-199412300-00014
- Horst, M., Brouwer, E., Verwijnen, S., Rodijk, M., De Jong, M., Hoeber, R., et al. (2007). Targeting malignant gliomas with a glial fibrillary acidic protein (GFAP)-selective oncolytic adenovirus. *J. Gene Med.* 9, 1071–1079. doi: 10.1002/jgm.1110
- Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D. W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J. Cell Biol.* 187, 761–772. doi: 10.1083/jcb.200908164
- Jakobsson, J., Georgievska, B., Ericson, C., and Lundberg, C. (2004). Lesion-dependent regulation of transgene expression in the rat brain using a human glial fibrillary acidic protein-lentiviral vector. *Eur. J. Neurosci.* 19, 761–765. doi: 10.1111/j.0953-816X.2003.03147.x
- Jaraya, B., Boulet, S., Ralph, G. S., Jan, C., Bonvento, G., Azzouz, M., et al. (2009). Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci. Transl. Med.* 1, 2ra4. doi: 10.1126/scitranslmed.3000130
- Jerusalinsky, D., Baez, M. V., and Epstein, A. L. (2012). Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases. *J. Physiol. Paris* 106, 2–11. doi: 10.1016/j.jphysparis.2011.11.003
- Kapit, M. G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H. L., Mattis, P., Lawlor, P. A., et al. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369, 2097–2105. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60982-9
- Kapit, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L., et al. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* 8, 148–154. doi: 10.1038/ng1094-148
- Kay, M. A., Glorioso, J. C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33–40. doi: 10.1038/83324
- Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O. J., Wobus, C. E., Bettinger, K., et al. (2003). Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J. Virol.* 77, 11072–11081. doi: 10.1128/JVI.77.20.11072-11081.2003
- Kirik, D., Annett, L. E., Burger, C., Muzyczka, N., Mandel, R. J., and Bjorklund, A. (2003). Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2884–2889. doi: 10.1073/pnas.0536383100
- Kirik, D., Rosenblad, C., Bjorklund, A., and Mandel, R. J. (2000). Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J. Neurosci.* 20, 4686–4700.
- Klatzmann, D., Valery, C. A., Bensimon, G., Marro, B., Boyer, O., Mokhtari, K., et al. (1998). A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum. Gene Ther.* 9, 2595–2604. doi: 10.1089/hum.1998.9.17-2595

- Klein, R. L., Dayton, R. D., Tatom, J. B., Henderson, K. M., and Henning, P. P. (2008). AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol. Ther.* 16, 89–96. doi: 10.1038/sj.mt.6300331
- Kordower, J. H., Bloch, J., Ma, S. Y., Chu, Y., Palfi, S., Roitberg, B. Z., et al. (1999). Lentiviral gene transfer to the nonhuman primate brain. *Exp. Neurol.* 160, 1–16. doi: 10.1006/exnr.1999.7178
- Kosik, K. S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 911–920. doi: 10.1038/nrn2037
- Kroeger, K. M., Muhammad, A. K., Baker, G. J., Assi, H., Wibowo, M. K., Xiong, W., et al. (2010). Gene therapy and virotherapy: novel therapeutic approaches for brain tumors. *Discov. Med.* 10, 293–304.
- Kugler, S., Lingor, P., Scholl, U., Zolotukhin, S., and Bahr, M. (2003). Differential transgene expression in brain cells in vivo and in vitro from AAV-2 vectors with small transcriptional control units. *Virology* 311, 89–95. doi: 10.1016/S0042-6822(03)00162-4
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00809-6
- Lang, A. E., Gill, S., Patel, N. K., Lozano, A., Nutt, J. G., Penn, R., et al. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 59, 459–466. doi: 10.1002/ana.20737
- Lawlor, P. A., Bland, R. J., Mouravlev, A., Young, D., and During, M. J. (2009). Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Mol. Ther.* 17, 1692–1702. doi: 10.1038/mt.2009.170
- Lee, Y., Messing, A., Su, M., and Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56, 481–493. doi: 10.1002/glia.20622
- Le Gal La Salle, G., Robert, J. J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., et al. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259, 988–990. doi: 10.1126/science.8382374
- Lewis, T. B., Glasgow, J. N., Glandon, A. M., Curriel, D. T., and Standaert, D. G. (2010). Transduction of brain dopamine neurons by adenoviral vectors is modulated by CAR expression: rationale for tropism modified vectors in PD gene therapy. *PLoS ONE* 5:e12672. doi: 10.1371/journal.pone.0012672
- Li, M., Husic, N., Lin, Y., Christensen, H., Malik, I., Mciver, S., et al. (2010). Optimal promoter usage for lentiviral vector-mediated transduction of cultured central nervous system cells. *J. Neurosci. Methods* 189, 56–64. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.03.019
- Liu, G., Martins, I. H., Chiorini, J. A., and Davidson, B. L. (2005). Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. *Gene Ther.* 12, 1503–1508. doi: 10.1038/sj.gt.3302554
- Liu, X., Bolteus, A. J., Balkin, D. M., Henschel, O., and Bordey, A. (2006). GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54, 394–410. doi: 10.1002/glia.20392
- Lundberg, C., Björklund, T., Carlsson, T., Jakobsson, J., Hantraye, P., Deglon, N., et al. (2008). Applications of lentiviral vectors for biology and gene therapy of neurological disorders. *Curr. Gene Ther.* 8, 461–473. doi: 10.2174/156652308786847996
- Lutschg, V., Boucke, K., Hemmi, S., and Greber, U. F. (2011). Chemotactic antiviral cytokines promote infectious apical entry of human adenovirus into polarized epithelial cells. *Nat. Commun.* 2, 391. doi: 10.1038/ncomms1391
- Mamber, C., Verhaagen, J., and Hol, E. M. (2010). In vivo targeting of subventricular zone astrocytes. *Prog. Neurobiol.* 92, 19–32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.04.007
- Mandel, R. J., Snyder, R. O., and Leff, S. E. (1999). Recombinant adeno-associated viral vector-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer protects nigral dopamine neurons after onset of progressive degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 160, 205–214. doi: 10.1006/exnr.1999.7203
- Manservigi, R., Argani, R., and Marconi, P. (2010). HSV recombinant vectors for gene therapy. *Open Virol. J.* 4, 123–156.
- Marks, W. J., Bartus, R. T., Siffert, J., Davis, C. S., Lozano, A., Boulis, N., et al. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 9, 1164–1172. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70254-4
- Martinet, O., Schreyer, N., Reis, E. D., and Joseph, J. M. (2003). Encapsulation of packaging cell line results in successful retroviral-mediated transfer of a suicide gene in vivo in an experimental model of glioblastoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* 29, 351–357. doi: 10.1053/ejso.2002.1386
- Miletic, H., Fischer, Y. H., Neumann, H., Hans, V., Stenzel, W., Girolglou, T., et al. (2004). Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Hum. Gene Ther.* 15, 1091–1100. doi: 10.1089/hum.2004.15.1091
- Miller, F. D., and Gauthier, A. S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357–369. doi: 10.1016/j.neuron.2007.04.019
- Molofsky, A. V., Krenick, R., Ullian, E. M., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., et al. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26, 891–907. doi: 10.1101/gad.188326.112
- Moran, E. (1993). Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *FASEB J.* 7, 880–885.
- Murphy, A. M., and Rabkin, S. D. (2013). Current status of gene therapy for brain tumors. *Transl. Res.* 161, 339–354. doi: 10.1016/j.trsl.2012.11.003
- Nakai, H., Yant, S. R., Storm, T. A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M. A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J. Virol.* 75, 6969–6976. doi: 10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., and Verma, I. M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11382–11388. doi: 10.1073/pnas.93.21.11382
- O'Carroll, D., and Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology* 38, 39–54. doi: 10.1038/npp.2012.87
- Opie, S. R., Warrington, K. H. Jr., Agbandje-Mckenna, M., Zolotukhin, S., and Muzyczka, N. (2003). Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J. Virol.* 77, 6995–7006. doi: 10.1128/JVI.77.12.6995-7006.2003
- Packer, R. J., Raffel, C., Villablanca, J. G., Tonn, J. C., Burdach, S. E., Burger, K., et al. (2000). Treatment of progressive or recurrent pediatric malignant supratentorial brain tumors with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration. *J. Neurosurg.* 92, 249–254. doi: 10.3171/jns.2000.92.2.0249
- Page, K. A., Landau, N. R., and Littman, D. R. (1990). Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J. Virol.* 64, 5270–5276.
- Palfi, S. (2008). Towards gene therapy for Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 7, 375–376. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70066-8
- Parker, J. N., Bauer, D. F., Cody, J. J., and Markert, J. M. (2009). Oncolytic viral therapy of malignant glioma. *Neurotherapeutics* 6, 558–569. doi: 10.1016/j.nurt.2009.04.011
- Pertusa, M., Garcia-Matas, S., Mameri, H., Adell, A., Rodrigo, T., Mallet, J., et al. (2008). Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats. *Neurobiol. Aging* 29, 1366–1379. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.026
- Pfriege, F. W., and Slezak, M. (2012). Genetic approaches to study glial cells in the rodent brain. *Glia* 60, 681–701. doi: 10.1002/glia.22283
- Portales-Casamar, E., Swanson, D. J., Liu, L., De Leeuw, C. N., Banks, K. G., Ho Sui, S. J., et al. (2010). A regulatory toolbox of MiniPromoters to drive selective expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16589–16594. doi: 10.1073/pnas.1009158107
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat. Med.* 5, 71–77. doi: 10.1038/8526
- Rabinowitz, J. E., and Samulski, J. (1998). Adeno-associated virus expression systems for gene transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 470–475. doi: 10.1016/S0958-1669(98)80031-1
- Rainov, N. G. (2000). A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum. Gene Ther.* 11, 2389–2401. doi: 10.1089/104303400750038499
- Ram, Z., Culver, K. W., Oshiro, E. M., Viola, J. J., Devroom, H. L.,

- Otto, E., et al. (1997). Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat. Med.* 3, 1354–1361. doi: 10.1038/nm1297-1354
- Ram, Z., Culver, K. W., Walbridge, S., Blaese, R. M., and Oldfield, E. H. (1993). In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res.* 53, 83–88.
- Ram, Z., Walbridge, S., Shawker, T., Culver, K. W., Blaese, R. M., and Oldfield, E. H. (1994). The effect of thymidine kinase transduction and ganciclovir therapy on tumor vascularity and growth of 9L gliomas in rats. *J. Neurosurg.* 81, 256–260. doi: 10.3171/jns.1994.81.2.0256
- Regan, M. R., Huang, Y. H., Kim, Y. S., Dykes-Hoberg, M. L., Jin, L., Watkins, A. M., et al. (2007). Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J. Neurosci.* 27, 6607–6619. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0790-07.2007
- Rubin, B. A., and Rorke, L. B. (1994). "Adenovirus vaccines," in *Vaccines*, eds. S. A. Plotkin and E. A. Mortimer (Philadelphia: W. B. Saunders), 475–502.
- Rubio, N., and Martin-Clemente, B. (2002). Binding of adenovirus to its receptors in mouse astrocytes induces c-fos proto-oncogene and apoptosis. *Virology* 297, 211–219. doi: 10.1006/viro.2002.1426
- Russell, S. J., Peng, K. W., and Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* 30, 658–670. doi: 10.1038/nbt.2287
- Saugstad, J. A. (2010). MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 1564–1576. doi: 10.1038/jcbfm.2010.101
- Savchenko, V. L., McKenna, J. A., Nikonenko, I. R., and Skibo, G. G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96, 195–203. doi: 10.1016/S0304-5222(99)00538-2
- Schnepf, B. C., Jensen, R. L., Chen, C. L., Johnson, P. R., and Clark, K. R. (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* 79, 14793–14803. doi: 10.1128/JVI.79.23.14793-14803.2005
- Shand, N., Weber, F., Mariani, L., Bernstein, M., Gianella-Borradori, A., Long, Z., et al. (1999). A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum. Gene Ther.* 10, 2325–2335. doi: 10.1089/10430349950016979
- Shen, S., Bryant, K. D., Brown, S. M., Randell, S. H., and Asokan, A. (2011). Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J. Biol. Chem.* 286, 13532–13540. doi: 10.1074/jbc.M110.210922
- Shevtsova, Z., Malik, J. M., Michel, U., Bahr, M., and Kugler, S. (2005). Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. *Exp. Physiol.* 90, 53–59. doi: 10.1113/expphysiol.2004.028159
- Smirnova, L., Grafe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., and Wulczyn, F. G. (2005). Regulation of miRNA expression during neuronal cell specification. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1469–1477. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03978.x
- Smith, G. M., Hale, J., Pasnikowski, E. M., Lindsay, R. M., Wong, V., and Rudge, J. S. (1996). Astrocytes infected with replication-defective adenovirus containing a secreted form of CNTF or NT3 show enhanced support of neuronal populations in vitro. *Exp. Neurol.* 139, 156–166. doi: 10.1006/exnr.1996.0090
- Sofroniew, M. V., and Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8
- Soudais, C., Laplace-Builhe, C., Kissa, K., and Kremer, E. J. (2001). Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport in vivo. *FASEB J.* 15, 2283–2285.
- Stein, C. S., Martins, I., and Davidson, B. L. (2005). The lymphocytic choriomeningitis virus envelope glycoprotein targets lentiviral gene transfer vector to neural progenitors in the murine brain. *Mol. Ther.* 11, 382–389. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.11.008
- Tuszynski, M. H., Thal, L., Pay, M., Salmon, D. P., U. H. S., Bakay, R., et al. (2005). A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.* 11, 551–555.
- Vite, C. H., Passini, M. A., Haskins, M. E., and Wolfe, J. H. (2003). Adeno-associated virus vector-mediated transduction in the cat brain. *Gene Ther.* 10, 1874–1881. doi: 10.1038/sj.gt.3302087
- Walker, B. A., Hengst, U., Kim, H. J., Jeon, N. L., Schmidt, E. F., Heintz, N., et al. (2012). Reprogramming axonal behavior by axon-specific viral transduction. *Gene Ther.* 19, 947–955. doi: 10.1038/gt.2011.217
- Wang, C., Wang, C. M., Clark, K. R., and Sferri, T. J. (2003). Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther.* 10, 1528–1534. doi: 10.1038/sj.gt.3302011
- Wang, C. Y., and Wang, S. (2006). Astrocytic expression of transgene in the rat brain mediated by baculovirus vectors containing an astrocyte-specific promoter. *Gene Ther.* 13, 1447–1456. doi: 10.1038/sj.gt.3302771
- Wang, L., Lin, F., Wang, J., Wu, J., Han, R., Zhu, L., et al. (2012). Expression of mutant N-terminal huntingtin fragment (htt552-100Q) in astrocytes suppresses the secretion of BDNF. *Brain Res.* 1449, 69–82. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.077
- Wanisch, K., and Yanez-Munoz, R. J. (2009). Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol. Ther.* 17, 1316–1332. doi: 10.1038/mt.2009.122
- Watson, D. J., Kobinger, G. P., Passini, M. A., Wilson, J. M., and Wolfe, J. H. (2002). Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. *Mol. Ther.* 5, 528–537. doi: 10.1006/mthe.2002.0584
- White, E., Bienemann, A., Taylor, H., Castrique, E., Bunnun, C., Wyatt, M., et al. (2011). An evaluation of site-specific immune responses directed against first-generation adenoviral vectors administered by convection-enhanced delivery. *J. Gene Med.* 13, 269–282. doi: 10.1002/jgm.1567
- Whitfield, T. W., Wang, J., Collins, P. J., Partridge, E. C., Aldred, S. E., Trinklein, N. D., et al. (2012). Functional analysis of transcription factor binding sites in human promoters. *Genome Biol.* 13, R50. doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r50
- Wongsrikeao, P., Saenz, D., Rinkoski, T., Otoi, T., and Poeschl, E. (2011). Antiviral restriction factor transgenesis in the domestic cat. *Nat. Methods* 8, 853–859. doi: 10.1038/nmeth.1703
- Wu, Z., Asokan, A., Grieger, J. C., Govindasamy, L., Agbandje-Mckenna, M., and Samulski, R. J. (2006a). Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. *J. Virol.* 80, 11393–11397. doi: 10.1128/JVI.01288-06
- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-Mckenna, M., and Samulski, R. J. (2006b). Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J. Virol.* 80, 9093–9103. doi: 10.1128/JVI.00895-06
- Yang, S. H., Cheng, P. H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J. J., Cheng, E. C., et al. (2008). Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453, 921–924. doi: 10.1038/nature06975
- Yla-Herttuala, S. (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol. Ther.* 20, 1831–1832. doi: 10.1038/mt.2012.194
- Zemp, F. J., Corredor, J. C., Lun, X., Muruve, D. A., and Forsyth, P. A. (2010). Oncolytic viruses as experimental treatments for malignant gliomas: using a scourge to treat a devil. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 103–117. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.04.001
- Zhang, Y., and Barres, B. A. (2010). Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 588–594. doi: 10.1016/j.conb.2010.06.005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 25 April 2013; accepted: 18 June 2013; published online: 05 July 2013.

Citation: Merienne N, Le Douce J, Faivre E, Dégion N and Bonvento G (2013) Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors. *Front. Cell. Neurosci.* 7:106. doi: 10.3389/fncel.2013.00106

Copyright © 2013 Merienne, Le Douce, Faivre, Dégion and Bonvento. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Publication 2: Channel-Mediated Lactate Release by K⁺-Stimulated Astrocytes.

Sotelo-Hitschfeld T., Niemeyer M., Machler P., Ruminot I., Lerchundi R., Wyss M., Stobart J., Fernandez-Moncada I., Valdebenito R., Garrido-Gerter P., Contreras-Baeza Y., Schneider B., Aebischer P., Lengacher S., San Martín A., Le Douce J., Bonvento G., Magistretti P., Sepulveda F., Weber B., Barros L.F. **Channel-Mediated Lactate Release by K⁺-Stimulated Astrocytes.** J Neuroscience. Mar 11;35(10):4168-78.

Channel-Mediated Lactate Release by K^+ -Stimulated Astrocytes

Tamara Sotelo-Hitschfeld,^{1,4} María I. Niemeyer,¹ Philipp Mächler,^{2,3} Iván Ruminot,¹ Rodrigo Lerchundi,^{1,4} Matthias T. Wyss,^{2,3} Jillian Stobart,^{2,3} Ignacio Fernández-Moncada,^{1,4} Rocío Valdebenito,¹ Pamela Garrido-Gerter,^{1,4} Yasna Contreras-Baeza,^{1,4} Bernard L. Schneider,⁵ Patrick Aebischer,⁵ Sylvain Lengacher,⁵ Alejandro San Martín,^{1,4} Juliette Le Douce,⁶ Gilles Bonvento,⁶ Pierre J. Magistretti,^{5,7} Francisco V. Sepúlveda,¹ Bruno Weber,^{2,3} and L. Felipe Barros¹

¹Centro de Estudios Científicos, Valdivia 5110466, Chile, ²Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Zürich, 8057 Zürich, Switzerland, ³Neuroscience Center Zürich, University and ETH Zürich, 8092 Zürich, Switzerland, ⁴Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, ⁵Brain Mind Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland, ⁶Commissariat à l'Energie Atomique, Institut d'Imagerie Biomédicale, Molecular Imaging Research Center and Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR 9199, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France, and ⁷Division of Biological and Environmental Sciences and Engineering, Kaust, Saudi Arabia

Excitatory synaptic transmission is accompanied by a local surge in interstitial lactate that occurs despite adequate oxygen availability, a puzzling phenomenon termed aerobic glycolysis. In addition to its role as an energy substrate, recent studies have shown that lactate modulates neuronal excitability acting through various targets, including NMDA receptors and G-protein-coupled receptors specific for lactate, but little is known about the cellular and molecular mechanisms responsible for the increase in interstitial lactate. Using a panel of genetically encoded fluorescence nanosensors for energy metabolites, we show here that mouse astrocytes in culture, in cortical slices, and *in vivo* maintain a steady-state reservoir of lactate. The reservoir was released to the extracellular space immediately after exposure of astrocytes to a physiological rise in extracellular K^+ or cell depolarization. Cell-attached patch-clamp analysis of cultured astrocytes revealed a 37 pS lactate-permeable ion channel activated by cell depolarization. The channel was modulated by lactate itself, resulting in a positive feedback loop for lactate release. A rapid fall in intracellular lactate levels was also observed in cortical astrocytes of anesthetized mice in response to local field stimulation. The existence of an astrocytic lactate reservoir and its quick mobilization via an ion channel in response to a neuronal cue provides fresh support to lactate roles in neuronal fueling and in gliotransmission.

Key words: fluorescence microscopy; genetically encoded nanosensor; gliotransmission; membrane depolarization

Introduction

The discovery of surface lactate receptors in neurons and other brain cells (Bozzo et al., 2013; Lauritzen et al., 2013; Tang et al., 2014) has rekindled interest in the local extracellular lactate rise that develops within seconds of neural activation (Prichard et al.,

1991; Hu and Wilson, 1997; Barros, 2013). Some of us have recently proposed a mechanism contributing to the lactate transient that is based on the observation that a rise in extracellular K^+ ($[K^+]_o$), such as that recorded during neural activity, stimulates an astrocytic glucose consumption in culture and in brain slices, which also occurs within seconds (Bittner et al., 2011; Ruminot et al., 2011). Exposure of astrocytes to elevated $[K^+]_o$ was found to augment extracellular lactate, but, given the limited temporal resolution of standard biochemical techniques, it was not possible to ascertain whether K^+ -stimulated astrocytes were able to release lactate within seconds, the time frame of the interstitial lactate transient observed *in vivo*. Genetically encoded nanosensors specific for nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), lactate, and pyruvate, which were used here to map the fate of glucose and lactate during the first seconds of K^+ stimulation, have been developed since then (Hung et al., 2011; San Martín et al., 2013, 2014a). We report that astrocytes *in vitro* and *in vivo* maintain a cytosolic reservoir of lactate, which, in response to plasma membrane depolarization, is immediately released to the extracellular space via an ion channel that conducts lactate and is positively modulated by lactate itself.

Received Dec. 11, 2014; revised Jan. 9, 2015; accepted Jan. 13, 2015.

Author contributions: T.S.-H., M.I.N., M.T.W., F.V.S., B.W., and L.F.B. designed research; T.S.-H., M.I.N., P.M., L.R., R.L., M.T.W., L.F.-M., R.V., P.G.-G., Y.C.-B., A.S.M., and J.L.D. performed research; J.S., B.L.S., P.A., S.L., A.S.M., J.L.D., G.B., P.J.M., B.W., and L.F.B. contributed unpublished reagents/analytic tools; T.S.-H., M.I.N., P.M., L.R., R.L., M.T.W., L.F.-M., R.V., P.G.-G., Y.C.-B., A.S.M., F.V.S., B.W., and L.F.B. analyzed data; T.S.-H., F.V.S., B.W., and L.F.B. wrote the paper.

This research was partly funded by Fondecyt Grant 1130095 (to L.F.B.) and a joint grant from the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT)-Chile and the Deutsche Forschungsgemeinschaft to L.F.B. and Joachim W. Dettmer, TU Kaiserslautern, Germany (DFG-12, DE 231/25-1). B.W. is partly supported by the Clinical Research Priority Program of the University of Zurich on Molecular Imaging. We also thank the Evaluation-orientation de la Coopération Scientifique-Sud program (Grant C10504 to G.B. and L.F.B.) and the French National Research Agency ANR (Grant 2011 MALZ 003-02 to G.B.). The Centro de Estudios Científicos is funded by the Chilean Government through the Centers of Excellence Basal Financing Program of CONICYT. We thank Pablo Gid for helpful discussions, Karin Alegria for expert technical assistance, and Karen Everett for critical reading of the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to L. Felipe Barros, Centro de Estudios Científicos (CECs), Valdivia 5110466, Chile. E-mail: lbarros@cecs.cl.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5036-14.2015

Copyright © 2015 the authors 0270-6474/15/354168-11\$15.00/0

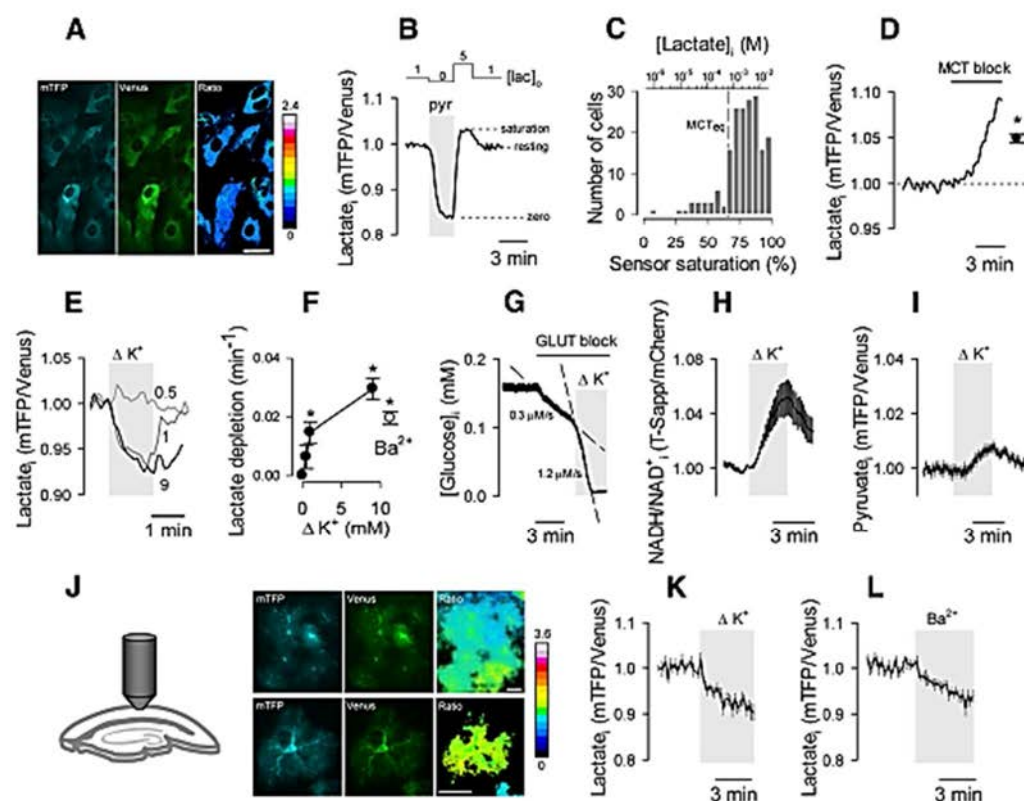


Figure 1. Astrocytes maintain a cytosolic lactate reservoir that is depleted in the short term by high $[K^+]_o$. **A**, The FRET lactate sensor Laconic expressed in the cytosol of cultured astrocytes, showing mTFP (blue), Venus (green), and the ratio between mTFP and Venus. Scale bar, 20 μ m. **B**, Laconic was first depleted of lactate by superfusion with 10 mM pyruvate (pyr), and then saturated with 5 mM lactate and 2 mM glucose (San Martín et al., 2013). **C**, Resting lactate level in 183 cells (17 experiments), estimated with the protocol in **B**. The top x-axis indicates lactate concentration, according to the kinetic parameters estimated *in vitro*. Equilibrium concentration (MCT_{eq}) of the monocarboxylate transporters. **D**, Response of intracellular lactate to 1 μ M AR-C155858. The closed symbol represents the average change after 5 min of MCT blockage. **E**, Effect of 0.5, 1, and 9 mM $[K^+]_o$ additions on the lactate level of an astrocyte. Resting $[K^+]_o = 3$ mM. **F**, Initial rates of K^+ -induced lactate depletion. The open symbol represents the initial rate of lactate depletion after exposure to 3 mM Ba^{2+} . **G–I**, Effect of a 9 mM $[K^+]_o$ rise on glucose consumption (**G**), cytosolic NADH/NAD $^+$ ratio (**H**), and cytosolic pyruvate level (**I**). **J**, Protoplasmic astrocytes expressing Laconic observed in an acute cortical slice at low (top) and high (bottom) magnification. Scale bar, 20 μ m. **K, L**, The effects of increasing $[K^+]_o$ by 9 mM (**K**) or by adding 3 mM Ba^{2+} (**L**) on the lactate level of protoplasmic astrocytes are shown.

Materials and Methods

Standard reagents and inhibitors were acquired from Sigma. AR-C155858 was purchased from Haoyuan Chemexpress. Plasmids encoding the sensors FLII 12 Pglu700 Δ 6 (Takanaga et al., 2008), Peredox (Hung et al., 2011), Laconic (San Martín et al., 2013), and Pyronic (San Martín et al., 2014a) are available from Addgene (www.addgene.org). Ad Laconic, Ad Pyronic, and Ad FLII 12 Pglu700 Δ 6 (all serotype 5) were custom made by Vector Biolabs. The adeno-associated virus (AAV9) expressing Laconic under the control of the short gfaABC $_1$ D promoter was generated at the École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Design, production, and titration of the AAV9 vector for transgene expression in astrocytes have been described previously (Dirren et al., 2014).

Animals

Animal procedures in Valdivia were approved by the Centro de Estudios Científicos Animal Care and Use Committee, following the recommendations of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council. Animals used were mixed F1 male mice (C57BL/6J6CBA/J), kept in an animal room under specific pathogen-free conditions at a room temperature of $20 \pm 2^\circ$ C, in a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. Surgical and experimental procedures in Zurich were approved by the local veterinary authorities, conforming to the guidelines of the Swiss Animal Protection Law, Veterinary Office, Canton Zurich (Act of Animal Protection 16 December 2005 and Animal Protection Ordinance 23 April 2008). Wild-type mice (C57BL/6J; Harlan Laboratories) 10 weeks

of age and with a body weight of 20 g were housed in single cages, with water and food available *ad libitum*.

Experimental preparations

Culture cells. Mixed cortical cultures of neuronal and glial cells were prepared from 1- to 3-d-old neonates (Loaiza et al., 2003). HEK293 cells were cultured as previously described (San Martín et al., 2013). HEK cells and astrocytes were plasmid transfected (0.5 μ g/ml) using Lipofectamine 2000 or 3000 (Life Technologies). Alternatively, astrocytes were exposed to 5×10^6 pfu of Ad Laconic, Ad Pyronic, or Ad FLII 12 Pglu700 Δ 6, and were studied after 48 h (culture days 8–10). Extracellular lactate levels were measured with the BioVision Lactate Assay Kit according to the instructions of the manufacturer.

Brain slices. Neonatal mice (days 1–3) were removed from the mother and anesthetized by hypothermia over 15 min. Animals were positioned upon a stage and injected with 1 μ l of AAV9 (titer 3.1E12 VG/ml) into the skull (Davidson et al., 2010) using a Fusion 100 syringe pump (Chemxy). After injection, the animals were positioned on a temperate bed until they recovered and then returned to the mother. After 4 weeks, animals were killed by cervical dislocation and coronal brain sections (200 μ m in thickness) were prepared as described previously (Jakoby et al., 2014).

Somatosensory cortex in vivo. Animals were anesthetized with an intraperitoneally injected mixture of fentanyl (0.05 mg/kg body weight; Sinteny, Sintetica), midazolam (5 mg/kg body weight; Dormicum, Roche), and medetomidine (0.5 mg/kg body weight; Domitor, Orion Pharma), and again after 50 min with midazolam only (5 mg/kg body weight). If

necessary, anesthesia was prolonged with isoflurane (0.5%; Abbott). The animal head was fixed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments), and the eyes were kept wet with an ointment (vitamin A eye cream; Bausch & Lomb). A 4 × 4 mm craniotomy was performed using a surgical drill (Osseodoc) and 200 nl of recombinant AAV9 (titer 3.1E12 VG/ml), carrying the genetically encoded lactate sensor Laconic, was injected into the primary somatosensory cortex. A square coverslip (3 × 3 mm, UQG Optics Ltd) was lightly pressed onto the exposed brain and fixed with dental cement to the skull. A bonding agent (Gluma Comfort Bond, Heraeus Kulzer) was applied to the cleaned skull and was polymerized with a handheld blue light source (600 mW/cm²; Demetron LC). A custom-made aluminum headpost was fixed to the bonding agent with dental cement (Tetric EvoFlow, Ivoclar Vivadent). The open skin was treated with an antibiotic ointment (Cicatex, Janssen-Cilag) and closed with acrylic glue (Histoacryl, B. Braun). After surgery the animals were kept warm and given analgesics (Novaminsulfon, 50%, Sintetica), and the antibiotic enrofloxacin was added to the drinking water for 5 d (200 mg/L drinking water; Baytril, Bayer).

Fluorescence imaging

Detailed protocols for the use of the fluorescent sensors are available (Hou et al., 2011; Tanihara et al., 2012; Barros et al., 2014; San Martín et al., 2014b). In the article describing the lactate sensor Laconic (San Martín et al., 2013), data were presented showing some sensitivity to pH in the alkaline range and also to citrate in the millimolar range. However, further characterization has shown that the sensitivities to pH and citrate were not a property of the sensor itself but *in vitro* artifacts respectively due to protein instability at room temperature in a noncellular milieu and divalent chelation by citrate. These results will be presented in detail in a separate manuscript (San Martín et al., manuscript in preparation). Measurements in cultured cells were performed at room temperature (22–24°C) in a 95% air/5% CO₂-gassed solution of the following composition (in mM): 112 NaCl, 3 KCl, 1.25 CaCl₂, 1.25 MgCl₂, 1–2 glucose, 10 HEPES, and 24 NaHCO₃, pH 7.4. Slice measurements were performed at room temperature (22–24°C) in a 95% O₂/5% CO₂-gassed solution of the following composition (in mM): 126 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.25 CaCl₂, 1.25 MgCl₂, 10 glucose, and 26 NaHCO₃, at pH 7.4. Cells and slices were imaged with an upright Olympus FV1000 confocal microscope equipped with a 20× water-immersion objective (numerical aperture, 1.0) and a 440 nm solid-state laser. Alternatively, cells were imaged with Olympus IX70 or BX51 microscopes equipped with Cairn Research monochromators and Optosplitters, and either a Hamamatsu Orca or Rollera camera. FLII¹²Pglu700Δ6, Laconic, and Pyronin were excited at 430 nm for 0.2–0.8 s, and were detected at 485/40 nm [cyan fluorescent protein or monomeric teal fluorescent protein (mTFP)] and 535/30 nm (Citrine or Venus). Peredox-mCherry was imaged at 410 nm excitation and 485/40 emission (T-sapphire), and 570 nm excitation and 610/50 nm emission (mCherry). Masked ratio images were generated from background-subtracted images using ImageJ software. The H⁺-sensitive dye 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF) was ester loaded at 0.1 μM for 3–4 min, and the signal was calibrated by exposing the cultures to solutions of different pH after permeabilizing the cells with 10 μg/ml nigericin and 20 μg/ml gramicidin in an intracellular buffer. BCECF was sequentially excited at 440 and 490 nm (0.05 s), and imaged at 535/30 nm. Calcein was ester loaded at 0.1 μM for 20 min and then imaged using confocal microscopy.

After 3 weeks of sensor expression, living mice were imaged with a custom-built two-photon laser-scanning microscope using a tunable pulsed (Mai Tai eHP DS system, Spectra-Physics) at a wavelength of 870 nm using a 20× water-immersion objective (W Plan-Apochromat 20×/1.0 differential interference contrast, Zeiss). The animals were head fixed and kept under anesthesia, as described above. Body temperature was kept constant with a feedback-controlled heating pad (37°C; Harvard Apparatus). Frame scans were acquired with ScanImage (r3.8.1; Janelia Research Campus; Pologruto et al., 2003) at 1.63 Hz and 512 × 512 pixels resolution. Single astrocytes of cortical layers L2/3 (150–250 μm below the dura) were outlined using ImageJ (1.46r; National Institutes of Health) and the mTFP channel (with bandpass filter 475/64; Semrock)

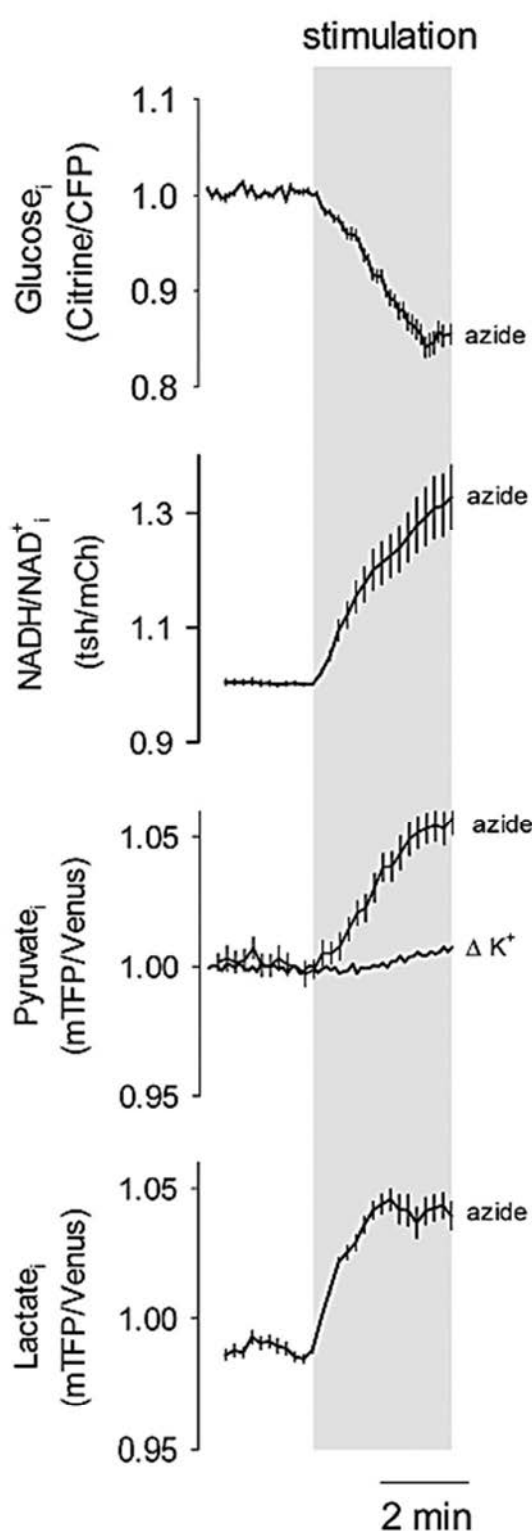


Figure 2. Intracellular lactate accumulation in response to OXPHOS inhibition. Astrocytes were exposed to 5 mM azide while measuring glucose, NADH/NAD⁺ ratio, pyruvate or lactate. The effect of 12 mM [K⁺]_o on pyruvate levels (from Fig. 1f) is shown for comparison.

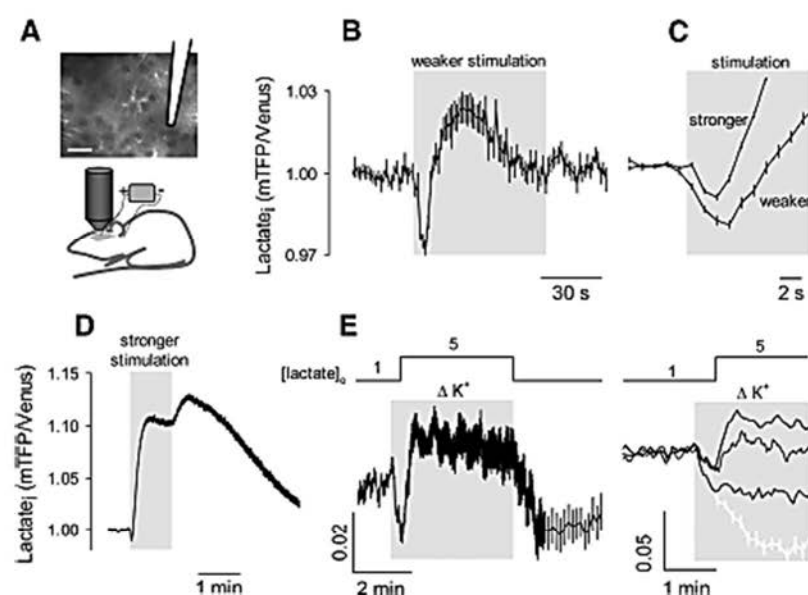


Figure 3. Early depletion of astrocytic lactate during local electrical stimulation *in vivo*. The strength of electrical stimulation was modulated by varying the distance between cells and the tip of the stimulation pipette, giving a weaker stimulation at 300–500 μm and a stronger stimulation at 20–200 μm . **A**, Imaging of Laconic expressed in somatosensory cortex astrocytes. The location of the stimulation pipette is indicated. Scale bar, 20 μm . **B**, Data from a single experiment. **C**, Early response to weaker ($n = 3$ experiments) and stronger stimulation ($n = 7$ experiments). **D**, Extended time course for stronger stimulation ($n = 7$ experiments). **E**, Left, Intracellular lactate level in cultured astrocytes exposed first to a 9 mM increase in $[\text{K}^+]_o$ and 30 s later, to a rise in extracellular lactate level from 1 to 5 mM. Right, Data from three cells from the same field (black) are compared with the average depletion elicited by a 9 mM $[\text{K}^+]_o$ increase at constant extracellular lactate concentration of 1 mM (white).

(Barry, 1994). Acquisition and analysis were performed with a Digidata 1200A analog-to-digital converter and Clampfit version 9.0 software (Molecular Devices). Acquisition was at 10 kHz with a filter (four-pole Bessel filter) at 3 kHz. Experiments were conducted at room temperature (20–24°C). N_p , where N is the number of active channels in the membrane patch and P_o is the open probability, was calculated using the single-channel search and event statistics algorithms in pClamp version 9.0 software. The mean current I passing through the N channels present in the patch was estimated from current amplitude histograms. Single-channel conductance estimates were made on the assumption that astrocytes had a membrane potential E_m of -80 mV (Ruminot et al., 2011). Intracellular lactate concentration was assumed to be 1.4 mM. An intracellular chloride concentration of 30 mM was assumed (Bekar and Walz, 2002). We used these concentrations to calculate cell-attached patch reversal potential E_{rev} values of 27 and -116 mV, respectively, for chloride and lactate.

Data presentation and statistical analysis

Line traces represent individual cells. Unless otherwise stated, traces with error bars correspond to the mean \pm SEM of eight or more cells ($n \geq 3$ experiments). Differences in mean values of paired samples were evaluated with the Student's t test. p values of <0.05 were considered significant and are indicated with an asterisk (*).

was divided by the Venus channel (with bandpass filter 542/50; Semrock), and the ratio was normalized to the corresponding baseline using Matlab (MathWorks). Glass capillaries (Science Products; GB120F-8P 0.69 \times 1.20 \times 80 mm with filament) were pulled to achieve an impedance of 1.5 M Ω at 1 kHz (P-87 pipette puller, Sutter Instrument Co.) and were filled with an artificial CSF solution of the following composition (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 glucose, 1.25 NaH₂PO₄, and 25 NaHCO₃, pH 7.4 (Laboratorium Dr. Bichsel AG, Interlaken, Switzerland). The glass of the cranial window was split using a diamond glass cutter and was partially removed. The pipette was mounted on a manipulator (SM-5, Luigs & Neumann) inserted under visual control and left to rest for 60 min before imaging. Intracortical microstimulation was applied with a DC cathodal current of 100 μA for 1 min (1 Hz train frequency, 100 ms trains at 330 Hz, 0.26 ms pulse width) using a constant-current isolator (STG 4002, Multi Channel Systems).

Electrophysiology

Culture dishes containing cortical astrocytes were transferred to the stage of an inverted microscope for study. They were continuously superfused with a bathing solution containing the following (in mM): 136 NaCl, 3 KCl, 1.25 MgCl₂, 1.25 CaCl₂, 2.0 Glucose, 1.0 NaLactate, and 10 HEPES-Tris, at pH 7.4 and osmolality of 300 mOsm. The pipette solution contained the following (in mM): 145 NaLactate, 1.0 NaCl, 3.0 KCl, 3.0 BaCl₂, and 10 HEPES-Tris 10 mM, at pH 7.4 and osmolality of 300 mOsm. Recordings of single channels in the cell-attached patch-clamp configuration were performed using 6- to 12-d-old astrocytes. Patch pipettes made from borosilicate glass were fire polished and covered in beeswax, and had a tip resistance of 3–4 M Ω (measured using the pipette solution described above). After obtaining G Ω seals, currents were measured using a List Medical L/M-EPC5 amplifier. An Ag/AgCl pellet acted as a bath ground and was connected to the bathing solution via a 0.5 M KCl agar bridge. Potentials were corrected for liquid junction shifts

Results

Resting astrocytes maintain a standing lactate reservoir

Astrocyte lactate dynamics were monitored in real time with Laconic, the Förster resonance energy transfer (FRET) lactate nanosensor (San Martín et al., 2013; Fig. 1A). To estimate resting lactate levels in cultured astrocytes, cells were first emptied of lactate by accelerated exchange with pyruvate and then exposed to saturating levels of lactate, a two-point calibration protocol that has been described in detail previously (San Martín et al., 2013). With this approach, the sensor was found to be close to saturation in most astrocytes (Fig. 1B,C). Using the kinetic parameters obtained *in vitro* (San Martín et al., 2013), the average concentration of cytosolic lactate was estimated to be 1.4 ± 0.02 mM ($n = 183$ cells in 17 experiments). The transport of lactate across the astrocytic plasma membrane is mediated by monocarboxylate transporters (MCTs) that catalyze the electroneutral cotransport of a lactate anion and an H⁺ ion. With 1 mM lactate in the superfusate at a pH of 7.4, and a mean intracellular pH of 7.2 ± 0.02 ($n = 43$ cells in 3 experiments), MCTs in astrocytes are at thermodynamic equilibrium at 0.63 mM intracellular lactate ($[\text{lactate}]_o \times [\text{H}^+]_o = [\text{lactate}]_i \times [\text{H}^+]_i$). As shown in Figure 1C, 88% of the astrocytes maintained cytosolic lactate levels above equilibrium in the resting condition. MCT blockage with AR-C155858 (Ovens et al., 2010) led to further intracellular lactate accumulation (Fig. 1D), providing independent evidence that resting astrocytes are tonic lactate producers that keep lactate above the MCT equilibrium.

Depolarization by high $[\text{K}^+]_o$ depletes astrocytic lactate

A rise in $[\text{K}^+]_o$ has been reported to stimulate astrocytic glucose consumption, glycogen mobilization, and lactate production in cell cultures and in tissue slices (Hof et al., 1988; Bittner et al.,

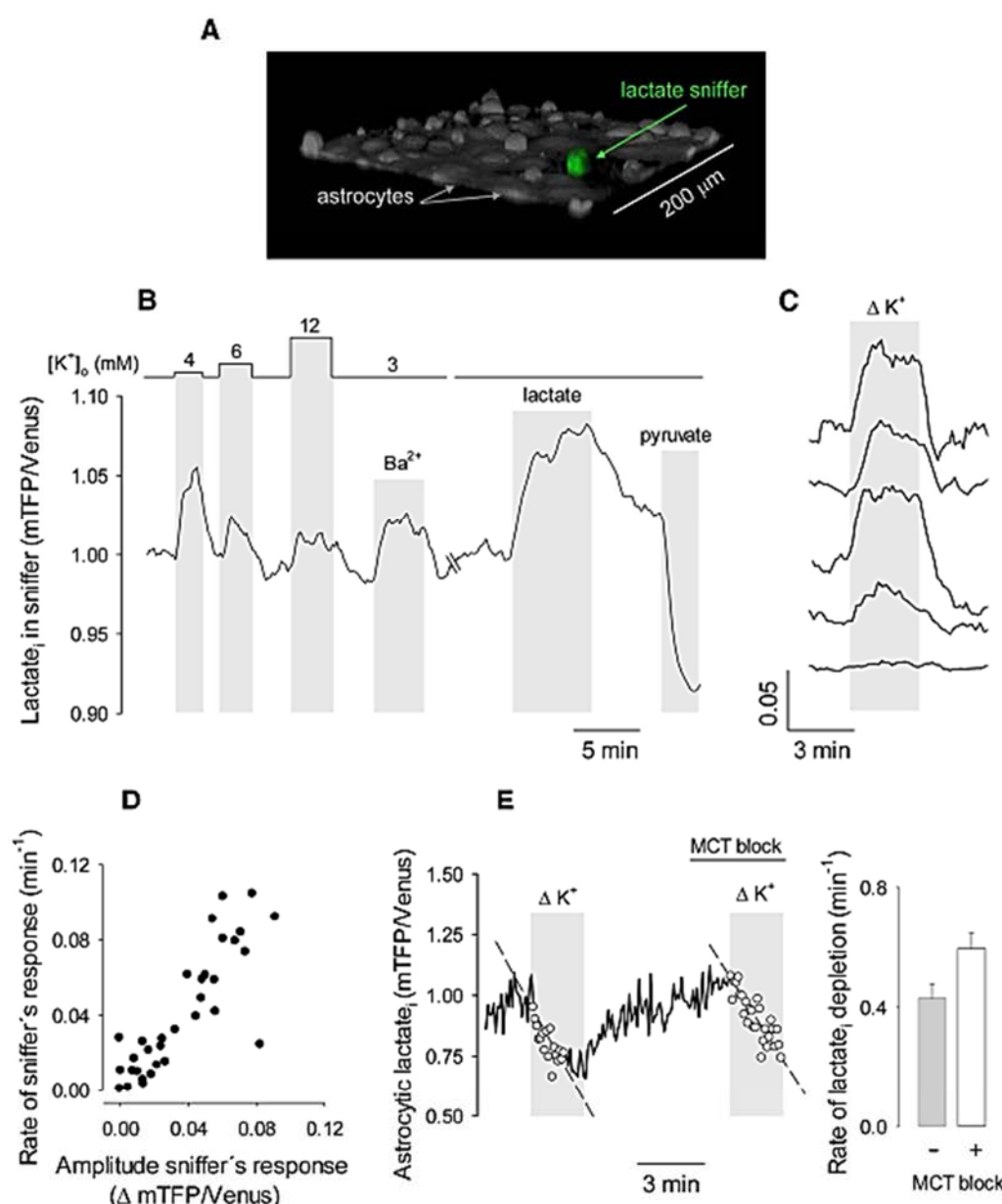


Figure 4. Fast astrocytic lactate release detected with a lactate sniffer. **A**, HEK293 cells expressing Laconic (sniffers) were seeded on top of an astrocytic culture and imaged by 3D confocal microscopy (green). A second 3D reconstruction was performed after ester loading the culture with calcein (gray). **B**, Response of a sniffer positioned on top of an astrocytic culture to increasing concentrations of [K⁺]_o (4, 6, and 12 mM), 3 mM Ba²⁺, 1 mM lactate, and 10 mM pyruvate. The experiment was performed in 2 mM glucose and 0 mM lactate. **C**, Typical response of sniffers to astrocytic culture exposure to 12 mM K⁺. **D**, Correlation between the amplitude and the initial rate of the response of the sniffer to 12 mM K⁺. **E**, Astrocytic lactate depletion by 12 mM K⁺ in the absence (gray symbols and bars) and presence (white symbols and bars) of 1 μ M AR-C155858.

2011; Ruminot et al., 2011; Choi et al., 2012; Sotelo-Hitschfeld et al., 2012). Therefore, we expected to find increased cytosolic lactate levels in K⁺-stimulated astrocytes. Paradoxically, high [K⁺]_o led to depletion of the cytosolic lactate reservoir (Fig. 1E). The phenomenon was evoked with 4 mM K⁺, a mere 1 mM over resting [K⁺]_o (Fig. 1E,F) and within the range reported in brain interstice during physiological neural activity (Fröhlich et al., 2008). The effect of K⁺ was mimicked by Ba²⁺ (Fig. 1F), which depolarizes the plasma membrane by blocking K⁺ channels (Ruminot et al., 2011). As reported (Bittner et al., 2011), the mea-

surement of glucose consumption by applying a glucose transporter GLUT blocker (Bittner et al., 2010) to astrocytes expressing the glucose nanosensor FLII¹²Pglu700 μ Δ6 (Takanaga et al., 2008) showed that high [K⁺]_o stimulated glycolysis by >300% (Fig. 1G). Consistent with an increased glycolytic rate, Peredox (Hung et al., 2011) showed an increased NADH/NAD⁺ ratio (Fig. 1H). However, Pyronic (San Martín et al., 2014a) revealed that cytosolic pyruvate concentrations increased slightly and only after a delay of ~30 s (Fig. 1I). The weak response of pyruvate to such strong glycolytic activation is consistent with the

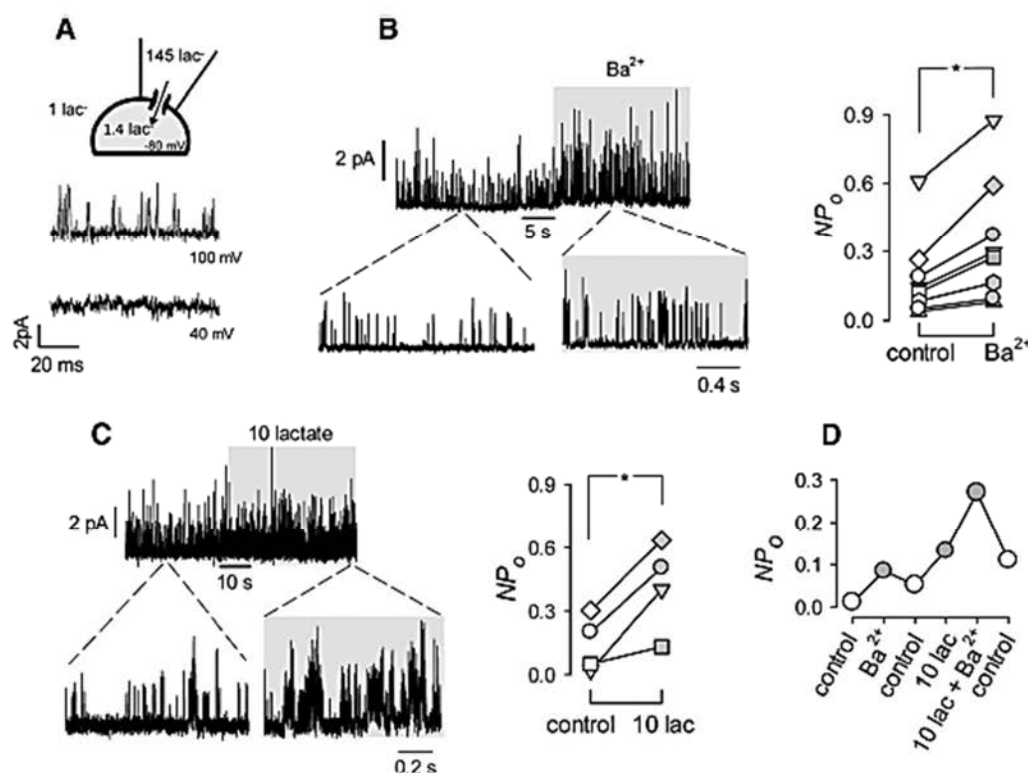


Figure 5. A lactate-permeable channel modulated by membrane depolarization and lactate. *A*, Traces obtained under lactate-rich (145 mM) and chloride-low (10 mM) pipette conditions in the cell-attached mode at 100 and 40 mV applied potential. *B*, Left, Recording from an astrocyte patch held at 0 mV (80 mV applied potential) before and during exposure of the cell to 3 mM Ba²⁺. Right, The channel activity in eight similar experiments is illustrated as NP_o, the product of the number of channels in the patch and the open probability of each channel. *C*, Left, Effect of increasing bath lactate concentration from 1 to 10 mM on channel activity. Right, Summary of four similar experiments. *D*, A cell was sequentially bathed with 3 mM Ba²⁺ and/or 10 mM lactate for periods of 5 min as shown.

simultaneous operation of a lactate dehydrogenase (LDH)-mediated pyruvate sink driven by the lactate depletion and NADH increase. The phenomenon of lactate depletion seemed specific to high [K⁺]_o, as the inhibition of oxidative phosphorylation (OXPHOS), which also stimulated glycolysis and increased the cytosolic NADH/NAD⁺ ratio, led to the expected immediate accumulation of both pyruvate and lactate (Fig. 2). To study astrocytes in the tissue context, a recombinant adeno-associated virus coding for LacGFP under the short gfaABC₁D promoter was stereotactically injected into the brain of neonatal mice, followed by cortical slice preparation and FRET determinations 4 weeks later. As illustrated in Figure 1*J–L*, when the slice was exposed to high [K⁺]_o or Ba²⁺, protoplasmic astrocytes responded with a lactate depletion similar to that observed in culture. Considering the responses in cultured cells and in tissue slices of lactate, glucose, NADH/NAD⁺ ratio, and pyruvate, we hypothesized that astrocytic depolarization by high [K⁺]_o stimulated lactate release to a larger extent than glycolytic lactate production.

Lactate dynamics *in vivo*

The lactate sensor was expressed in astrocytes of the primary somatosensory cortex of adult mice using the adeno-associated viral vector and was then imaged under anesthesia through a cranial window with two-photon microscopy (Fig. 3*A*). Local field stimulation that increases [K⁺]_o *in vivo* and depolarizes astrocytes within seconds (Chesler, 2003; Fröhlich et al., 2008) elicited a complex astrocytic lactate response. Immediately after

the onset of stimulation, there was a fast transient decrease, followed by an overshoot and a secondary decrease despite continued stimulation (Fig. 3*B*). The lactate dip does not seem to arise from a stimulation artifact, as astrocytes located near the stimulation pipette showed a smaller dip (Fig. 3*C*). This stronger stimulation provoked a faster and larger overshoot that maintained cytosolic lactate above baseline levels long after stimulation had ended (Fig. 3*D*). Whereas electrical stimulation may affect metabolism by several mechanisms, a possible interpretation for the complex response observed *in vivo* is that the initial lactate dip is mediated by high [K⁺]_o, as observed *in vitro*, and that the overshoot reflects the interstitial lactate buildup known to occur *in vivo*. Consistent with this explanation, both dip and overshoot could be mimicked in cultured astrocytes by elevating extracellular lactate levels a few seconds after the application of K⁺ (Fig. 3*E*). The effect of adding lactate was variable from cell to cell, ranging from a slight decrease in the rate of lactate depletion to a proper overshoot (Fig. 3*E*). In view of the results described below, this is likely explained by variable balancing between MCT-mediated lactate influx and channel-mediated lactate efflux.

Astrocytes release lactate within seconds of membrane depolarization

Augmented lactate efflux in response to astrocyte depolarization was first confirmed with an enzymatic assay, which showed that a 1 min exposure of cultured astrocytes to 12 mM [K⁺]_o increased extracellular lactate by 69 ± 7%. For better temporal resolution,

a lactate-sniffer cell was engineered by expressing Laconic in wild-type HEK293 cells, which are MCT rich (San Martín et al., 2013, 2014a) and insensitive to glycolytic modulation by K^+ (Ruminot et al., 2011). To estimate lactate levels in the immediate vicinity of astrocytes, lactate sniffer cells were seeded on top of the astrocytic monolayer (Fig. 4A). Within seconds of exposing the cultures to elevated $[K^+]_o$ or Ba^{2+} level, the sniffers detected a higher extracellular lactate (Fig. 4B). The typical response was a rapid rise to a new steady state, which reverted to baseline levels after agonist removal, although we saw considerable cell-to-cell variability (Fig. 4C,D). Control experiments in the absence of astrocytes showed that intracellular lactate in HEK293 cells was insensitive to 12 mM $[K^+]_o$ or 3 mM Ba^{2+} (data not shown). These results indicate that astrocytes release lactate within seconds of membrane depolarization, thus explaining the intracellular depletion despite glycolytic stimulation. Next, we focused on the mechanisms underlying the lactate release, with first possible candidates being MCTs. However, the MCT blocker AR-C155858, which abrogates lactate permeation in these cells (San Martín et al., 2013, 2014a), had no apparent effect on the lactate depletion (Fig. 4E), pointing to the existence of an alternative release pathway.

Channel-mediated lactate release by astrocytes

Our search for a lactate conductance started with whole-cell patch-clamp experiments, but no significant currents could be detected with a lactate-rich pipette at resting membrane potential or during depolarization ($n = 6$ experiments, data not shown). Experiments were therefore performed in the cell-attached configuration, a minimally invasive approach that leaves the intracellular milieu unperturbed, using a pipette solution rich in lactate, low in chloride, and supplemented with 3 mM Ba^{2+} to eliminate the potassium conductance (Ruminot et al., 2011). Assuming intracellular concentrations of 1.4 mM for lactate (see above) and of 30 mM for chloride (Bekar and Walz, 2002), approximate lactate reversal potential $E_{lactate}$ and chloride reversal potential E_{Cl} values are -116 and 27 mV, respectively. Records obtained under these conditions at an applied potential of 100 mV revealed transient outward currents consistent with ion channel activity (Fig. 5A). At an astrocytic membrane potential of -80 mV (Ruminot et al., 2011), this applied potential translates into a nominal patch potential of 20 mV, which is well above $E_{lactate}$ but below E_{Cl} . The only ion species capable of carrying this current is lactate, as chloride and sodium movements would generate inward currents. Accordingly, the currents became progressively smaller at more negative potentials (Figs. 5A,

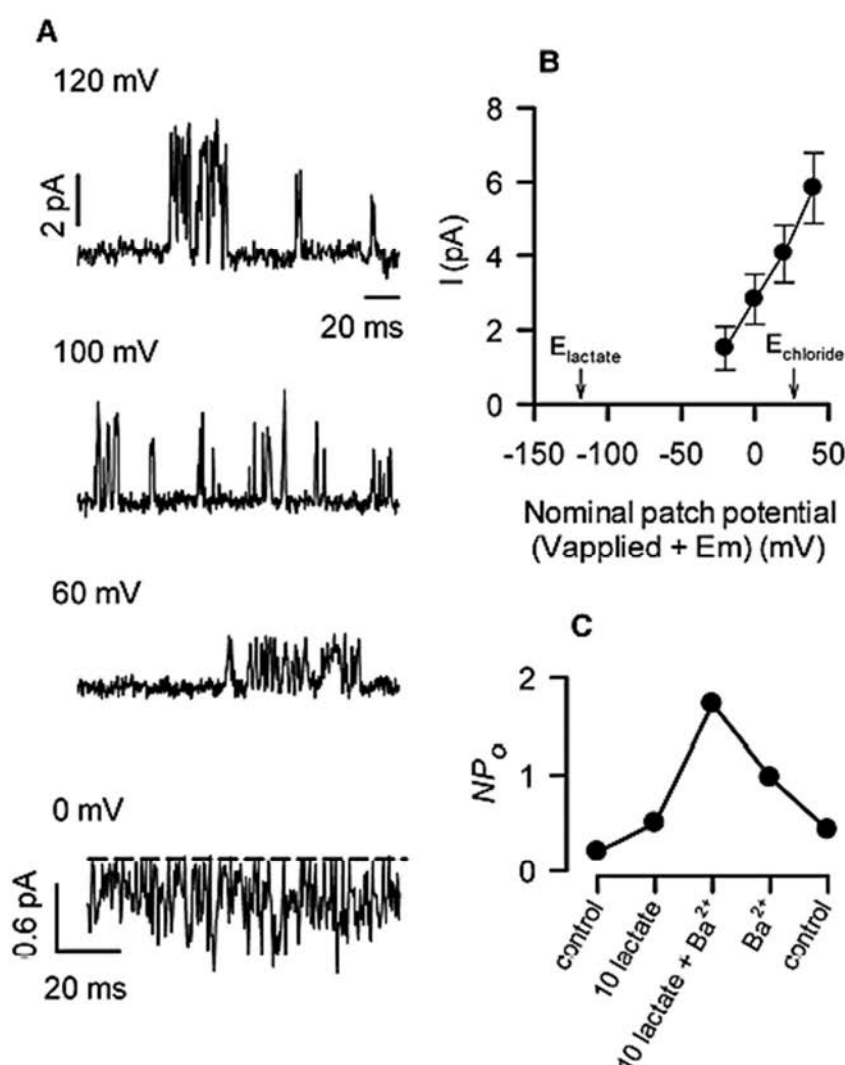


Figure 6. Further characterization of the lactate-permeable channel. *A*, Traces obtained with a lactate-rich (145 mM), chloride-low (10 mM) medium, with pipette in the cell-attached mode at 120, 100, 60, and 0 applied potential. *B*, Single-channel current obtained at increasing nominal patch potentials (calculated assuming an astrocytic membrane potential of -80 mV). The equilibrium potentials estimated for lactate and chloride are indicated. *C*, A cell was sequentially bathed with 10 mM lactate and 3 mM Ba^{2+} for periods of 5 min as shown.

6). Small inward currents were detected at a nominal patch potential of -80 mV (Fig. 6), suggesting that the channel also allows chloride to pass. For simplicity, we will use the term “lactate channel” to refer to this lactate-permeable channel. At a 40 mV nominal patch potential, the single-channel conductance of the lactate channel was 37 ± 6 pS ($n = 6$). Currents were detected in $\sim 50\%$ of the patches examined. It was not possible to test the effect of cell depolarization with high $[K^+]_o$, as this maneuver destabilized the patch and prevented reliable current determinations. However, cell depolarization by adding Ba^{2+} to the superfusate stabilized the patch, permitting prolonged experiments to be performed. Within seconds of exposure to Ba^{2+} , the open probability of the channel became significantly higher regardless of basal activity (Fig. 5B). Surprisingly, the activity of the channel was further increased when cells were superfused with a solution containing a higher concentration of lactate (Fig. 5C). The stimulatory effects of Ba^{2+} and lactate on channel activity were additive and reverted upon removal from the bathing solution, but

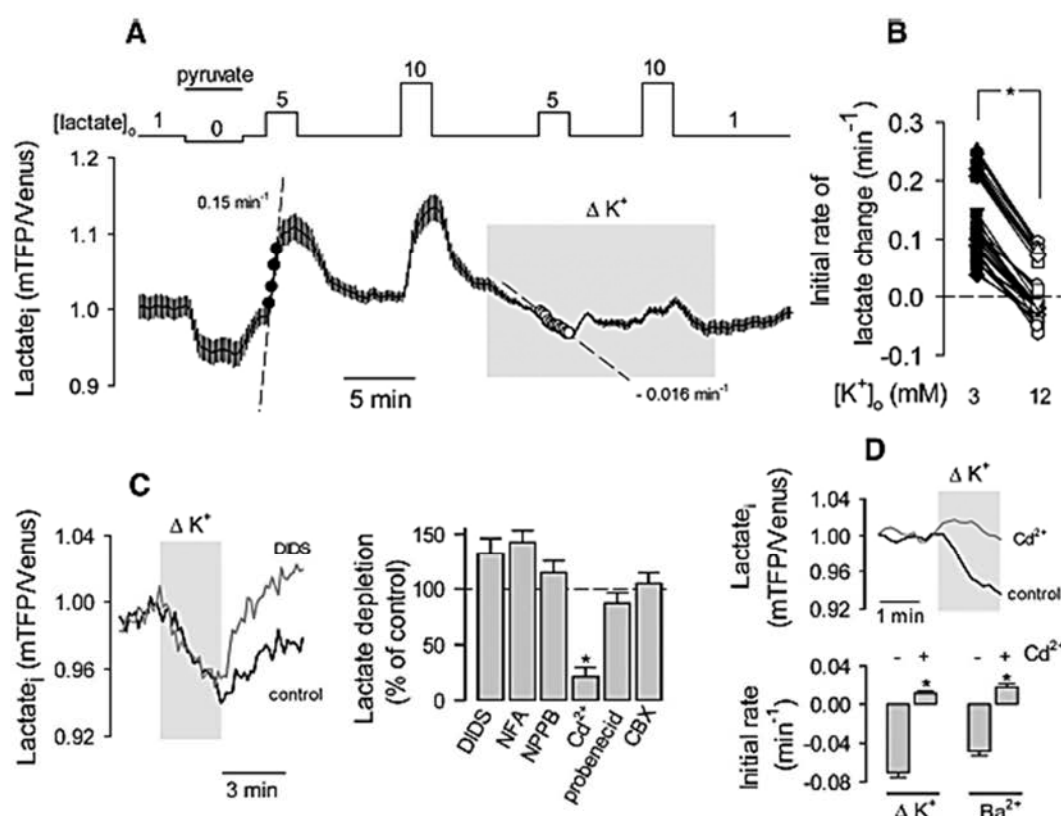


Figure 7. Stimulated astrocytes can extrude lactate against a lactate gradient. **A**, Astrocytes were sequentially exposed to 10 mM pyruvate and then to 5 and 10 mM lactate in the presence of 3 or 12 mM [K⁺]_o. **B**, Summary of three similar experiments showing the initial rates of 5 mM lactate accumulation in 3 or 12 mM [K⁺]_o on intracellular lactate was monitored in a single astrocyte before and during exposure to 200 μM DIDS. **C**, Left, The effect of a 9 mM increase in [K⁺]_o on intracellular lactate was monitored in single astrocytes before and during exposure to 200 μM DIDS. Right, Summary of similar experiments, with 200 μM DIDS, 500 μM NFA, 500 μM NPPB, 200 μM Cd²⁺, 1 mM probenecid, or 10 μM CBX. Data are the rates of lactate depletion measured over 2 min (*n* = 3 experiments and 16–32 cells were used for each inhibitor). **D**, Top, The effects of a 9 mM increase in [K⁺]_o or the addition of 3 mM Ba²⁺ on intracellular lactate level were monitored in single astrocytes before and during exposure to 200 μM Cd²⁺. Bottom, Initial rates measured during the first minute of exposure to [K⁺]_o or 3 mM Ba²⁺ in the absence or presence of 200 μM Cd²⁺.

this reversion was partial, at least over a period of minutes (Figs. 5D, 6).

MCTs are responsible for the lactate permeability of resting astrocytes (Barros and Deitmer, 2010; Bouzier-Sore and Pellerin, 2013; Stobart and Anderson, 2013). The high permeability of astrocytes to lactate is illustrated in Figure 7A as a rapid accumulation of cytosolic lactate in response to high extracellular lactate. However, when high lactate was applied in the presence of high [K⁺]_o, the rise in lactate was smaller than that seen under resting conditions (Fig. 7A,B). In ~50% of cells, the 5 mM lactate pulse provoked intracellular lactate depletion (Fig. 7A,B). The latter result is highly informative as it means that despite high levels of extracellular lactate, efflux through the channel may still surpass influx through MCTs. It also means that the positive modulation of the channel by lactate, as described electrophysiologically, must occur at an extracellular site. The cell-attached configuration is not amenable to pharmacological characterization, so we used the initial depletion detected with the FRET nanosensor as a readout of channel activity. Considering the negative charge of lactate and the possible chloride current detected at 0 mV applied potential (Fig. 6), we tested a panel of anion channel blockers but found that only Cd²⁺ was able to inhibit K⁺-induced lactate depletion to a significant extent (Fig. 7C). The pannexin channel blocker probenecid and the connexin hemichannel blocker CBX were not effective (Fig. 7C). On closer inspection, it became apparent that Cd²⁺ strongly inhibited lactate depletion immedi-

ately after the application of K⁺ or Ba²⁺, but that its effect became weaker over time (Fig. 7D). This suggests that there may be more than one pathway involved, and that the Cd²⁺-sensitive channel is responsible for the early phase of the lactate release.

Discussion

The main finding of this study is that astrocytes release lactate via an ion channel in response to a small rise in extracellular K⁺. The lactate-permeable channel was positively modulated by lactate itself. Resting astrocytes were found to accumulate lactate well above MCT thermodynamic equilibrium: a dynamic reservoir that was quickly mobilized in response to high [K⁺]_o. Astrocytes are therefore equipped with a mechanism for the targeted delivery of lactate, which fits well to the emerging role of lactate as a signaling molecule (Fig. 8).

The transport of lactate across the plasma membrane of astrocytes and most other mammalian cells is mediated by H⁺-coupled monocarboxylate transporters (Halestrap and Price, 1999; Barros and Deitmer, 2010; Bouzier-Sore and Pellerin, 2013; San Martín et al., 2013; Stobart and Anderson, 2013). Standard uptake assays based on isotopic tracers or pH-sensitive dyes show that lactate permeability of astrocytes is high, and no significant lactate gradients have been presumed to exist across the plasma membrane. With the FRET nanosensor, we were able to estimate lactate in the steady state and found that most astrocytes maintained lactate levels above thermodynamic equilibrium. In re-

sponse to high $[K^+]_o$, cytosolic lactate levels fell despite strong concurrent stimulation of glucose consumption. Pyruvate levels were almost unaffected, suggesting a close match between increased pyruvate production from glucose and pyruvate consumption by LDH, driven by a lower lactate level and an increased NADH/NAD⁺ ratio. The K⁺-dependent lactate depletion appears to be a robust phenomenon, as it was observed in both primary cultures and in protoplasmic astrocytes of adult brain slices. It has also been recorded in organotypical hippocampal slices (I. Ruminot and J.W. Deitmer, unpublished data). Also, within seconds of K⁺ stimulation, a sniffer cell detected the release of lactate by astrocytes. Both lactate depletion and release were mimicked by Ba²⁺, a maneuver that does not engage K⁺ transporters (Gatto et al., 2007), suggesting that the phenomenon is chiefly mediated by membrane depolarization. In living animals, electrical stimulation of the somatosensory cortex triggered a complex astrocytic lactate response, with an initial dip and a delayed overshoot. As lactate modulates astrocytic glycolysis within seconds (Sotelo-Hitschfeld et al., 2012), the lactate dip may contribute to the stimulation of glycolysis by high $[K^+]_o$. Although the depletion phase of the lactate dip observed in protoplasmic astrocytes *in vivo* correlates with the K⁺-dependent depletion observed in cultured astrocytes and in protoplasmic astrocytes *in vitro*, and we could mimic both dip and overshoot under culture conditions, the extent to which the lactate dip *in vivo* is mediated by K⁺ is not clear at this stage.

Electrical stimulation increases interstitial K⁺ and depolarizes astrocytes (Fröhlich et al., 2008), but also mobilizes other mediators that may affect lactate metabolism. The combination of cytosolic depletion and release is evidence of increased lactate permeability, an outcome that could not be ascribed to the MCTs, as pharmacological MCT blockade failed to prevent lactate depletion. Both the depletion of cytosolic lactate by high $[K^+]_o$ and the further depletion during a lactate pulse could be explained by the electrophysiological detection of a lactate-permeable ion channel, having an open probability increased by plasma membrane depolarization and by lactate. The lactate channel was not detected in the whole-cell configuration, suggesting the need for an intact intracellular milieu. Considering that the application of high lactate concentrations to K⁺-stimulated cells caused a decrease in intracellular lactate levels, the modulation of the channel by lactate seems to occur at the cell surface. One possible explanation may be direct gating of the channel by the permeant ion, a phenomenon that has already been described for anion channels (Pusch and Jentsch, 1994; Catalán et al., 2004).

To the best of our knowledge, there are no previous reports of lactate-permeable ion channels in astrocytes. The lactate-permeable channel of astrocytes was insensitive to 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), niflumic acid (NFA), 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid

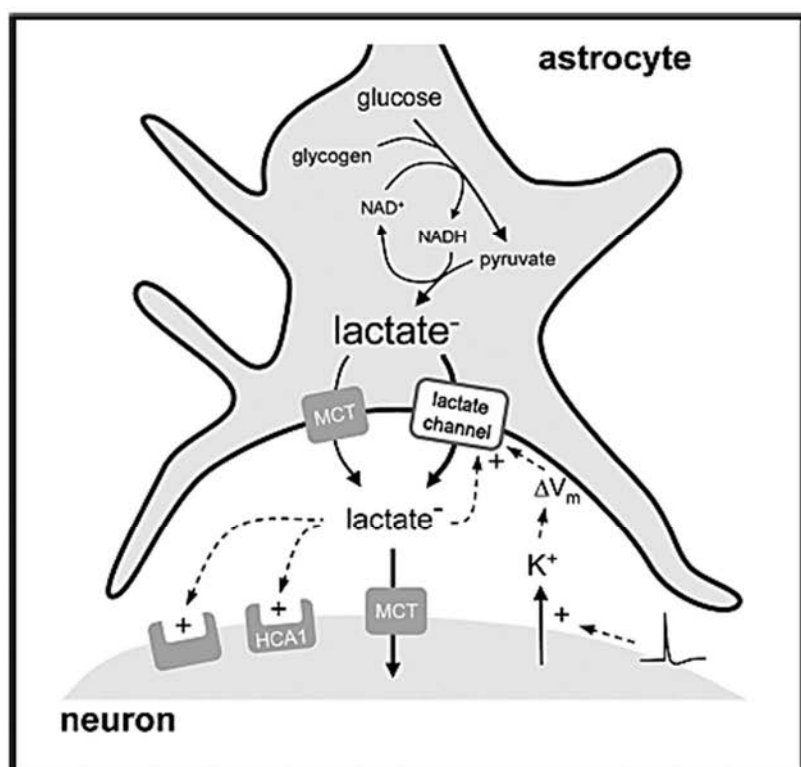


Figure 8. Activity-dependent channel-mediated lactate release by astrocytes. Resting astrocytes maintain a standing reservoir of cytosolic lactate, the result of a dynamic balance between glycolytic production and MCT-mediated lactate export. Active neurons release K⁺, which depolarizes the astrocytic plasma membrane (ΔV_m) and activates the lactate-permeable channel, resulting in lactate release, leading to higher $[lactate]_o$ and further lactate release through a positive feedback. Neurons may sense lactate through HCA1 (Bozzo et al., 2013; Lauritzen et al., 2013) and other surface lactate receptors (Tang et al., 2014), or after internalization of lactate via MCTs.

(NPPB), probenecid, and carbenoxolone (CBX), but was partially inhibited by Cd²⁺, a nonspecific ion channel inhibitor. Anion channels are notoriously insensitive to inhibitors (Kimelberg et al., 2006), which has made it very difficult to link functionally identified anion channels to their molecular counterparts (Jentsch et al., 2002). However, a breakthrough was made recently with the molecular identification of the volume-regulated anion channel VRAC (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). Anion channels in astrocytes are stimulated by ATP, cell swelling, shape changes, and other stimuli (Kimelberg et al., 2006), but we found no information on astrocytic anion channels activated by cell depolarization. This may be because electrophysiological measurements are normally performed in whole-cell voltage clamp, a configuration in which the lactate channel did not appear. It was, however, readily found in the cell-attached patch-clamp configuration, suggesting the need for a cytosolic factor that may be lost during dialysis. The main substrate of anion channels is chloride, but some of these channels may also transport large zwitterionic polyions such as taurine (125 Da; Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014), and are therefore likely to transport lactate, a smaller monovalent anion (88 Da). Lactate has not been routinely included in selectivity studies of anion channels. The maxi-anion channel is present in astrocytes (Kimelberg et al., 2006), but its conductance seems too large (>300 pS for chloride, and presumably >100 pS for lactate) to account for the lactate permeability described here. Conductance may also be invoked

against connexins and pannexins (>200 pS; Giaume et al., 2013), together with the observed insensitivity of the lactate channel to carbenoxolone and probenecid, and the fact that connexins and pannexins are permeable to cations.

An activity-dependent lactate channel in astrocytes has consequences for brain lactate dynamics. There are fundamental differences between the standard transport of lactate via MCTs and transport via an ion channel; one of these is vectorial flux. Lactate is a monovalent anion, and at the resting membrane potential of astrocytes (-80 mV) lactate will flow through the channel against a 20-fold chemical gradient. At 12 mM $[K^+]_o$, the membrane potential of a "depolarized" astrocyte is still -60 mV (Ruminot et al., 2011), a voltage at which channel-mediated efflux will occur against a 10-fold chemical gradient. This explains how an imposed fivefold rise in extracellular lactate failed to increase intracellular lactate levels in K^+ -stimulated astrocytes (Fig. 3E). In contrast, MCT-mediated transport is electroneutral and may only extrude lactate if there is a favorable combined chemical gradient for lactate and H^+ . During neural activity, astrocytes become more alkaline and neurons acidify (Chesler, 2003), a combination that works against the transfer of lactate from astrocytes to neurons (Barros and Deitmer, 2010). Using a pathway that is H^+ independent and sensitive to membrane potential, astrocytes may push lactate toward neurons regardless of the pH gradient, even if lactate has accumulated in the interstice. Another relevant property of channels is their unmatched throughput rate. Assuming linear dose dependence, we can calculate that a single 37 pS channel (adjusted at 1.4 mM and -60 mV) conducts $>10^5$ lactate molecules per second, about a thousand times faster than the maximum turnover number of MCT1 (Ovens et al., 2010). Astrocytic lactate has been proposed to serve as an energy substrate for active neurons, a mechanism known as the astrocyte-to-neuron lactate shuttle (ANLS; Pellerin and Magistretti, 1994; Bouzier-Sore and Pellerin, 2013; Stobart and Anderson, 2013). In its standard version, ANLS is mediated by MCTs, and therefore the direction of flux is determined by the lactate gradient between both cells, which is unknown (Barros and Deitmer, 2010). The lactate channel strengthens the ANLS by providing obligatory vectorial flux (energized by the astrocytic membrane potential), activity dependence (mediated by $[K^+]_o$), and a much higher throughput rate.

In addition to a role in neurometabolic coupling, the lactate channel may contribute to intercellular signaling. The G_i -protein-coupled receptor for lactate HCA1 (GPR81) was recently described in synaptic regions, perivascular locations, and glia (Bergersen and Gjedde, 2012; Lauritzen et al., 2013), whereas the engagement of HCA1 in cortical neurons in culture reduced their spontaneous activity (Bozzo et al., 2013). In the locus ceruleus, astrocytic lactate was found to excite neurons, a phenomenon mediated by a different surface lactate receptor (Tang et al., 2014). After entering neurons, lactate affects pH, the NADH/NAD $^+$ ratio, and the energy status, modulating enzyme catalysis, gene expression, and higher-order brain functions like memory consolidation (Gilbert et al., 2006; Suzuki et al., 2011; Barros, 2013; Yang et al., 2014). Because of the delicate geometry of protoplasmic astrocytes, their membrane potential is thought to be a local parameter, exquisitely sensitive to fluctuations in $[K^+]_o$ (Kofuji and Newman, 2004; Fröhlich et al., 2008; Witthoft et al., 2013). Depending on location, the lactate channel may sense the local rise in $[K^+]_o$ that accompanies excitatory neurotransmission and perhaps the activity of the nodes of Ranvier, which are contacted by astrocytic processes. A single channel may deliver lactate transiently as a localized jet, permitting accurate homing

of targets in neighboring cells and/or in autocrine fashion. The amplification conferred by the positive feedback modulation of the channel by lactate is expected to make the release even more abrupt. Astrocytes detect synaptic activity through metabotropic and ionotropic glutamate receptors, leading to the release of glutamate, ATP, and D-serine, small neuromodulators that are collectively termed gliotransmitters (Araque et al., 2014). Astrocytes can also detect synaptic activity through changes in local $[K^+]_o$. The neuromodulatory roles of lactate, its steady-state reservoir in astrocytes, and its fast release in response to K^+ , suggest that lactate may also qualify as a gliotransmitter.

References

- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728–739. CrossRef Medline
- Barros LF (2013) Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci* 36:396–404. CrossRef Medline
- Barros LF, Deitmer JW (2010) Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res Rev* 63:149–159. CrossRef Medline
- Barros LF, Baeza-Lehnert F, Valdebenito R, Ceballos S, Alegria K (2014) Fluorescent nanosensor based flux analysis: overview and the example of glucose. In: *Springer protocols: brain energy metabolism* (Waagepetersen HS, Hirrlinger J, eds), pp 145–159. Berlin: Springer.
- Barry PH (1994) JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Methods* 51:107–116. CrossRef Medline
- Bekar LK, Walz W (2002) Intracellular chloride modulates A-type potassium currents in astrocytes. *Glia* 39:207–216. CrossRef Medline
- Bergersen LH, Gjedde A (2012) Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? *Front Neuroenergetics* 4:5. CrossRef Medline
- Bittner CX, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Gutiérrez R, Córdova A, Valdebenito R, Frommer WB, Barros LF (2010) High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics* 2:26. CrossRef Medline
- Bittner CX, Valdebenito R, Ruminot I, Loaiza A, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Moldenhauer H, San Martín A, Gutiérrez R, Zambrano M, Barros LF (2011) Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K^+ and a delayed and persistent effect of glutamate. *J Neurosci* 31:4709–4713. CrossRef Medline
- Bouzier-Sore AK, Pellerin L (2013) Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7:179. CrossRef Medline
- Bozzo L, Puyal J, Chatton JY (2013) Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway. *PLoS One* 8:e71721. CrossRef Medline
- Catalán M, Niemeyer MI, Cid LP, Sepúlveda FV (2004) Basolateral ClC-2 chloride channels in surface colon epithelium: regulation by a direct effect of intracellular chloride. *Gastroenterology* 126:1104–1114. CrossRef Medline
- Chesler M (2003) Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 83:1183–1221. CrossRef Medline
- Choi HB, Gordon GR, Zhou N, Tai C, Rungta RL, Martinez J, Milner TA, Ryu JK, McLarnon JG, Tresguerres M, Levin LR, Buck J, MacVicar BA (2012) Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron* 75:1094–1104. CrossRef Medline
- Davidson S, Truong H, Nakagawa Y, Giesler GJ Jr (2010) A microinjection technique for targeting regions of embryonic and neonatal mouse brain in vivo. *Brain Res* 1307:43–52. CrossRef Medline
- Dirren E, Towne CL, Setola V, Redmond DE Jr, Schneider BL, Aebischer P (2014) Intracerebroventricular injection of adeno-associated virus 6 and 9 vectors for cell type-specific transgene expression in the spinal cord. *Hum Gene Ther* 25:109–120. CrossRef Medline
- Fröhlich F, Bazhenov M, Iragui-Madoz V, Sejnowski TJ (2008) Potassium dynamics in the epileptic cortex: new insights on an old topic. *Neuroscientist* 14:422–433. CrossRef Medline
- Gatto C, Arnett KL, Milanick MA (2007) Divalent cation interactions with Na $^+$, K-ATPase cytoplasmic cation sites: implications for the paratransphenyl phosphatase reaction mechanism. *J Membr Biol* 216:49–59. CrossRef Medline
- Giaume C, Leybaert L, Naus CC, Sáez JC (2013) Connexin and pannexin

- hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* 4:88. CrossRef Medline
- Gilbert E, Tang JM, Ludvig N, Bergold PJ (2006) Elevated lactate suppresses neuronal firing in vivo and inhibits glucose metabolism in hippocampal slice cultures. *Brain Res* 1117:213–223. CrossRef Medline
- Halestrap AP, Price NT (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343: 281–299. Medline
- Hof PR, Pascale E, Magistretti PJ (1988) K^+ at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca^{2+} -dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 8:1922–1928. Medline
- Hou BH, Takanaga H, Grossmann G, Chen LQ, Qu XQ, Jones AM, Lalonde S, Schweissgut O, Wiechert W, Frommer WB (2011) Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. *Nat Protoc* 6:1818–1833. CrossRef Medline
- Hu Y, Wilson GS (1997) A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J Neurochem* 69:1484–1490. CrossRef Medline
- Hung YP, Albeck JG, Tantama M, Yellen G (2011) Imaging cytosolic NADH-NAD(+) redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab* 14:545–554. CrossRef Medline
- Jakoby P, Schmidt E, Ruminot I, Gutiérrez R, Barros LF, Deitmer JW (2014) Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: a multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cereb Cortex* 24:222–231. CrossRef Medline
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82:503–568. CrossRef Medline
- Kimelberg HK, Macvicar BA, Sontheimer H (2006) Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54:747–757. CrossRef Medline
- Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045–1056. CrossRef Medline
- Lauritzen KH, Morland C, Puchades M, Holm-Hansen S, Hagelin EM, Lauritzen F, Attramadal H, Storm-Mathisen J, Gjedde A, Bergersen LH (2014) Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cereb Cortex* 10:2784–2795. CrossRef Medline
- Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23:7337–7342. Medline
- Ovens MJ, Davies AJ, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP (2010) AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7–10. *Biochem J* 425:523–530. CrossRef Medline
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625–10629. CrossRef Medline
- Pologruto TA, Sabatini BL, Svoboda K (2003) ScanImage: flexible software for operating laser scanning microscopes. *Biomed Eng Online* 2:13. CrossRef Medline
- Prichard J, Rothman D, Novotny E, Petroff O, Kuwabara T, Avison M, Howseman A, Hanstock C, Shulman R (1991) Lactate rise detected by 1H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5829–5831. CrossRef Medline
- Pusch M, Jentsch TJ (1994) Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol Rev* 74:813–827. Medline
- Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, Tu B, Reddy K, Miraglia LJ, Reinhardt J, Orth AP, Patapoutian A (2014) SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* 157:447–458. CrossRef Medline
- Ruminot I, Gutiérrez R, Peña-Münzenmayer G, Añazco C, Sotelo-Hitschfeld T, Lerchundi R, Niemeyer MI, Shull GE, Barros LF (2011) NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic glycolysis by extracellular K^+ . *J Neurosci* 31:14264–14271. CrossRef Medline
- San Martín A, Ceballos S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF (2013) A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the warburg effect in single cancer cells. *PLoS One* 8:e57712. CrossRef Medline
- San Martín A, Ceballos S, Baeza-Lehnert F, Lerchundi R, Valdebenito R, Contreras-Baeza Y, Alegría K, Barros LF (2014a) Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS One* 9:e85780. CrossRef Medline
- San Martín A, Sotelo-Hitschfeld T, Lerchundi R, Fernández-moncada I, Ceballos S, Valdebenito R, Baeza-Lehnert F, Alegría K, Contreras-Baeza Y, Garrido-Gerter P, Romero-Gómez I, Barros LF (2014b) Single-cell imaging tools for brain energy metabolism: a review. *Neurophotonics* 1:011004. CrossRef
- Sotelo-Hitschfeld T, Fernández-Moncada I, Barros LF (2012) Acute feedback control of astrocytic glycolysis by lactate. *Glia* 60:674–680. CrossRef Medline
- Stobart JL, Anderson CM (2013) Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci* 7:38. CrossRef Medline
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810–823. CrossRef Medline
- Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB (2008) GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta* 1778:1091–1099. CrossRef Medline
- Tang F, Lane S, Korsak A, Paton JF, Gourine AV, Kasparov S, Teschemacher AG (2014) Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat Commun* 5:3284. CrossRef Medline
- Tantama M, Hung YP, Yellen G (2012) Optogenetic reporters: fluorescent protein-based genetically encoded of signaling and metabolism in the brain. In: *Progress in brain research* (Knopfel T, Boyden E, eds), pp 235–263. Amsterdam: Elsevier.
- Voss FK, Ullrich F, Münch J, Lazarow K, Lutter D, Mah N, Andrade-Navarro MA, von Kries JP, Stauber T, Jentsch TJ (2014) Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* 344:634–638. CrossRef Medline
- Witthoft A, Filosa JA, Karniadakis GE (2013) Potassium buffering in the neurovascular unit: models and sensitivity analysis. *Biophys J* 105:2046–2054. CrossRef Medline
- Yang J, Ruchti E, Petit JM, Jourdain P, Grenningloh G, Allaman I, Magistretti PJ (2014) Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:12228–12233. CrossRef Medline

Publication 3: Astrocytic 3-phosphoglycerate dehydrogenase links energy metabolism and LTP deficits in a mouse model of Alzheimer's Disease.

Le Douce J., Veran J., Faivre E., Hérard A.-S., Jegu P., Toussay X., Vanderberghe M., Balbastre Y., Delzescaux T., Hantraye P., Brouillet E., Piquet J., Tran N. T., Taverna, M., Cauli B., Olier S. H. R., Panatier A., Bonvento G. **Astrocytic 3-phosphoglycerate dehydrogenase links energy metabolism and LTP deficits in a mouse model of Alzheimer's Disease.** (In preparation)

Astrocytic 3-phosphoglycerate dehydrogenase links energy metabolism and LTP deficits in a mouse model of Alzheimer's Disease

Juliette Le Douce¹, Julien Veran², Emilie Faivre¹, Anne-Sophie Hérard¹, Pierrick Jégo¹, Xavier Toussay³, Michel Vandenberghe¹, Yaël Balastre¹, Juliette Piquet³, Thierry Delzescaux¹, Philippe Hantraye¹, Emmanuel Brouillet¹, Nguyet Thuy Tran⁴, Myriam Taverna⁴, Bruno Cauli³

Stéphane H.R. Olié², Aude Panatier², Gilles Bonvento¹

¹ *Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département des Sciences du Vivant (DSV), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), Molecular Imaging Center (MIRCen), CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France*

² *Neurocentre Magendie, Inserm U862, University of Bordeaux, Bordeaux, France.*

³ *Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UM 119, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France, CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France, INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France*

⁴ *Institut Galien Paris Sud, Université Paris Sud, CNRS UMR 8612, Châtenay-Malabry, France*

CORRESPONDING AUTHOR:

Gilles Bonvento, PhD

MIRCen and CNRS UMR 9199,

Fontenay-aux-Roses, France

Tel.: +33 14654 8330

Fax: +33 14654 9116

Email: gilles.bonvento@cea.fr

ABSTRACT

An early alteration of both cerebral glucose metabolism and synaptic activity has been consistently described in Alzheimer's disease (AD) patients. Metabolism of glucose via glycolysis and the citric acid cycle produces ATP that is essential for synaptic activity and plasticity. In the brain, glucose is predominantly processed glycolytically into astrocytes and not by neurons. Beyond ATP production, a major function of aerobic glycolysis is to provide precursors to support macromolecular synthesis. L-serine, generated from glucose through diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) into the phosphorylated pathway, is only produced in astrocytes by 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH), selectively expressed in those glial cells. L-serine is the precursor of D-serine, the main co-agonist of synaptic NMDAR, required for synaptic activity and plasticity. We used 3xTg-AD mice to investigate whether a defective astrocytic phosphorylated pathway contributes to early synaptic deficits in AD. We found that 3xTg-AD mice display early *in vivo* alterations of glucose metabolism, synaptic deficits (LTP and LTD) in the CA1 region and also lower concentration of L-serine. Expression of PHGDH was not significantly altered. Exogenous D-serine completely rescued both forms of synaptic plasticity in 3xTg-AD mice. These data support the hypothesis that a deficit of L-serine synthesis by astrocytes mediated by a decreased glycolytic flux may be responsible for the synaptic alteration mediated by NMDAR in the hippocampus of 3xTg-AD mice.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disorder characterized by progressive memory loss and cognitive impairment. AD neuropathology includes brain deposition of amyloid plaques formed by misfolded amyloid- β (A β), neurofibrillary tangles and synapse loss (Hardy and Selkoe, 2002, Spiess-Jones and Hyman, 2014).

The aggregation and subsequent cerebral accumulation of the amyloid- β (A β) peptide is a key initiating factor in AD, long before the onset of cognitive symptoms. It is well established that soluble A β 1-42 oligomers play an essential pathogenic role in decreased spine density, impairment of synaptic plasticity and neuronal loss (Lambert et al., 1998, Haass and Selkoe, 2007). Multiple studies have shown that long-term potentiation (LTP) is impaired in AD or A β -exposed hippocampus, and that this impairment is dependent on NMDARs but also AMPARs, metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and glutamate transporters (for references see (Tu et al., 2014)).

In addition, decreased glucose metabolism also occurs in specific brain regions during the pre-symptomatic period (Mosconi et al., 2010, Cohen and Klunk, 2014). This reduction of cerebral glucose metabolism correlates with disease progression and even predicts histopathological diagnosis in AD. Although both A β and Tau are central to AD pathogenesis, it is still unclear whether and how glucose dysregulation contributes to synaptic defects in AD (Chen and Zhong, 2013). Recent observations suggest that the complex metabolic arrangements occurring early in AD may depend heavily on astrocytes (Vlassenko et al., 2010). Glucose entering via facilitated transport across the blood brain barrier into both neurons and astrocytes represents an important source of energy for the brain. It has recently been shown that reduced glucose transporter 1 (GLUT1) expression in endothelial cells worsens cerebrovascular degeneration, neuropathology and cognitive function in an AD mouse model (Winkler et al., 2015). This shortage of glucose may directly reduce the availability of ATP required to sustain synaptic transmission but could also decrease the production of lactate, a product of aerobic glycolysis in astrocytes that was recently shown to be necessary for the maintenance of LTP (Suzuki et al., 2011, Yang et al., 2014). We have previously shown that another gliotransmitter released from astrocytes, the NMDAR co-agonist D-serine, is also required for LTP (Henneberger et al., 2010).

Interestingly, D-serine is also generated from glucose through diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) into the phosphorylated pathway. The first committed step in this pathway is the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate by the specific astrocytic enzyme 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH) (Yamasaki et al., 2001). The critical role of PHGDH to generate D-serine (Yang et al., 2010) directly in astrocytes and indirectly in neurons after import of astrocytic L-serine has been recently reported (Ehmsen et al., 2013).

We therefore sought to investigate whether a defective astrocytic phosphorylated pathway contributes to early synaptic deficits in AD. We found that 3xTg-AD mice display early *in vivo* alterations of glucose metabolism, synaptic deficits (LTP and LTD) in the CA1 region and also lower concentration of L-serine. Exogenous D-serine completely rescued both forms of synaptic plasticity in 3xTg-AD mice. These data support the hypothesis that a deficit of L-serine synthesis by astrocytes mediated by a decreased glycolytic flux may be responsible for the synaptic alteration mediated by NMDAR in the hippocampus of 3xTg-AD mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experimental procedures using animals were performed in strict accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130) and conformed to the ethical guidelines of both the European Economic Community (86/609/EEC) and the French National Charter on the ethics of animal experimentation. They were approved by a local ethics committee and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approval 14-015). The animal facility is accredited by the French authorities (B9-032-02). We used homozygous 3xTg-AD mice generated and maintained in a mixed J29/C57BL6 background (MMRRC #034830). 3xTg-AD mice express the mutated gene PS1M146V (knock-in) and mutated human genes APPSwe and tauP301L in the same locus, both under the control of the mouse Thy1.2 regulatory element (Oddo et al, Neuron 2003). We also used age-matched NonTg control mice on the same background strain (J29/C57BL6).

In Vivo [¹⁴C]-2-Deoxyglucose Uptake

We measured [¹⁴C]-2-Deoxyglucose (2-DG) uptake in four experimental groups: 6-month-old female 3xTg-AD mice (n=10), 6-month-old female WT mice (n=9), 12-month-old female 3xTg-AD mice (n=10) and 12-month-old female WT mice (n=10). Experiments were performed in conscious, lightly restrained animals that were previously habituated to the constraint. Animals were fasted for 12 hours before the experiment but had free access to water. On the day of the experiment, mice were anesthetized with isoflurane (2% in O₂) and two catheters were inserted into the femoral artery and vein, respectively. Body temperature was maintained at 37°C. Mice were allowed to recover from anesthesia for 1 hour and were intravenously injected with [¹⁴C]-2DG (16.5 mCi/100 g body weight; Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Glycemia was measured using DIGL-100 QuantiChrom™ Glucose Assay Kit. Mice were euthanized by injection of a lethal dose of sodium pentobarbital. The brains were rapidly removed and immediately frozen at -40°C in isopentane. They were cut into 20 µm-thick coronal sections with a CM3050S cryostat (Leica, Rueil-Malmaison, France). Every second section was mounted on coverslip, rapidly heat-dried, and placed against autoradiographic film (Kodak Biomax MR) for 10 days together with radioactive [¹⁴C] standards (146C, American Radiochemical Company, St Louis, MO, USA). Every second section was mounted on Superfrost glass slides that were then processed for Nissl staining, to obtain additional information about brain anatomy.

Postmortem Image Registration, Three-Dimensional Reconstruction and Analysis

Autoradiographic and Nissl-stained sections were digitized using a high-resolution flatbed scanner (ImageScanner III; GE Healthcare Europe, Orsay, France) at 600 dpi (pixel size 42 x 42 µm²) and 1,200 dpi (pixel size 21 x 21 µm²) in-plane resolution, respectively. Image processing was performed using our in-house software platform BrainVISA (<http://brainvisa.info/>). Each anatomic volume was first reconstructed in 3D, and each autoradiographic volume was reconstructed in 3D using the corresponding anatomic volume as geometrical reference for co-registration (Dubois et al., 2010).

Autoradiographic images were converted from gray levels to activity (nCi/g) using the [14C] standards and normalized at 200 nCi/g. A brain template was created using all the anatomic brain volumes at a final resolution of 0.05 x 0.05 x 0.1 μm^3 . Regional differences in cerebral glucose uptake between 3xTG and WT mice were then assessed using a voxel-based two-tailed unpaired t-test implemented in BrainVISA (Vandenberghe et al, in prep).

Immunofluorescence

Mice were euthanized by an overdose of pentobarbital and perfused transcardially with 100 ml of cold 4% paraformaldehyde (PFA) solution in phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.4). Brains were cryoprotected in a 30% sucrose solution in PB for 24h. Sagittal and coronal brain sections (35 μm) were cut on a freezing microtome, collected serially, and stored at -20°C until additional analysis. Slices were permeabilized, blocked with 0.2% Triton X-100 (Sigma) and 4.5% normal goat serum (Sigma) for 30 min and were incubated overnight at room temperature (RT) with the following primary antibodies: GFAP (1:1000, rabbit; Dako), PHGDH (1:500, guinea pig; Frontier Institute) and NeuN (1:500, mouse; Chemicon), IBA1 (1:1000, rabbit; Dako). After rinsing, brain slices were incubated for 3h at RT with fluorescent secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (Invitrogen) and mounted with FluorSave reagent (Calbiochem). For SRR labeling, the tissue sections were blocked with 4% mouse IgG blocking reagent (Vector Laboratories) and incubated with anti-SRR antibody (1:500, mouse; BD Biosciences). After rinsing, the sections were incubated with the ImmPRESS HRP Anti-Mouse Ig (Peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories) following the manufacturer's protocol, and then with Alexa 594-tyramide in an amplification buffer (Perkin Elmer).

Immunohistochemistry

Brain slices were pretreated in 0.3% H_2O_2 , blocked in 4.5% NGS (Sigma), and incubated with the following primary antibodies: 4G8 (1:1000, mouse; Signet Covance), AT8 (1:400, mouse; ThermoScientific), OC (1:500, rabbit, Millipore), AT180 (1:1000, mouse, ThermoScientific), HT7 (1:500,

mouse, Innogenetics) for 48h at 4°C. After rinsing, brain slices were incubated with biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories) for 1h at RT. Finally, they were incubated with the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) and revealed with the DAB kit (Vector Laboratories).

Image analysis

Images were acquired using confocal microscopy (Leica SP8) and were analyzed using Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>). Analysis of the astrocyte ramification and of the corresponding immunofluorescence staining was performed from stacked confocal images (13 steps; z-step 1µm, maximum intensity stack) acquired with the 40X objective, zoom 2 (pixel size of 0.284 x 0.284 µm²). The image stacks of GFAP staining were reconstructed as binarized representations and the Sholl method of concentric circles (Sholl, 1953) was used to determine astrocyte ramification. Each cell was manually outlined to exclude adjacent cells by tracing a region of interest (ROI) and was analyzed by selecting the center of its soma and then running the Sholl analysis procedure, which counts the number of intersections at circles of increasing radii (1µm increased radius between each ring) from the center. The ROI was then applied on the image stacks of PHGDH staining to measure the mean grey value of each analyzed astrocyte. The maximal ring with an intersecting process (max distance), the sum of the number of intersections (branching complexity) for all circles and the ramification index were calculated for each cell and compared among groups to the corresponding mean grey value of PHGDH staining.

Immunoblotting

Mice were killed with an overdose of sodium pentobarbital. Brains were rapidly collected and sliced into 1-mm thick coronal sections with a brain matrix and the subiculum was dissected out. Samples were then homogenized with a sonicator (cycle 0.5, amplification 30%, 6 strokes) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1% SDS, with protease (Roche) and phosphatase (Sigma) inhibitor cocktails. Protein concentration was determined by the BCA method. Protein samples were diluted in NuPAGE LDS sample buffer with NuPAGE Sample Reducing agent (Life Technologies), boiled for 10 min, loaded on

a 4–12% Bis-Tris gel, submitted to SDS-PAGE, and transferred to a nitrocellulose membrane, with an iBlot transfer device (Life Technologies). Membranes were blocked in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, 5% milk for 30 min at RT then blotted overnight at 4°C with antibodies against PHGDH (1:500), SRR (1:1000) and Actin (1:5000, rabbit; Sigma) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and 5% milk. After rinsing, secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were incubated with the membrane for 1 h. Antibody binding was detected by a Fusion FX7 camera system (ThermoScientific) after incubation with the enhanced chemiluminescence Clarity substrate (Bio-Rad). Band intensity were measured with BioID software and normalized to actin expression.

Determination of L- and D-serine using chiral CE-LIF

Freshly dissected brains were cut using a brain matrix and the hippocampus was dissected from the slices using a stereomicroscope. Tissue samples were weighed, put on dry ice immediately after dissection and stored at –80°C until further processing. Brain tissue samples were homogenized by sonication for 5 s in ACN: water 2:1 solution (10µL/mg). Samples were centrifuged at 3000g for 10 min at 4°C to remove precipitated proteins. Then, the samples were kept at –80°C until analysis. Later on, 10 µL of sample was mixed with 37.5 µL derivatization buffer containing 20mM pH 10 borate, 1µM aminoadipic acid as internal standard and 6 µL of a solution at 5mg/mL of 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) in methanol. The mixture was heated at 65°C for 20 min and then stored at 7°C for 30 minutes. Quantitative analysis of L- and D-serine was performed using Capillary Electrophoresis coupled to Laser-induced Fluorescence (CE-LIF) detection according to (Lorenzo et al., 2013). Capillary electrophoresis experiments were carried out with a PA800+ ProteomeLab instrument (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The instrument was coupled with LIF detection equipped with a 3.5 mW argon-ion laser. Excitation and emission wavelengths were 488 and 520 nm, respectively. The silica capillary has a 75 µm diameter, 50 cm of effective length. All solutions were kept refrigerated at $7 \pm 2^\circ\text{C}$ in the CE autosampler. Data acquisition and instrument control were carried out using 32 Karat™ system software version 7.0 (Beckman Coulter, USA). Electrophoretic conditions were: 175 mM borate buffer at pH 10.25 prepared with 12.5 mM β -cyclodextrin, at 21 000 volts for 45 minutes.

Electrophysiology

Slice Preparation

Experiments were carried out on adult mice (7 months old) in accordance with the French National Code of Ethics on Animal Experimentation and approved by the Committee of Ethics of Bordeaux (authorization no. A50120109). Briefly, mice were anesthetized with isoflurane and euthanized. The brain was quickly removed from the skull and placed in cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. aCSF was used for dissection, slicing and recordings. The aCSF composition was (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose (pH 7.3, 300-305 mOsm/kg). A block of tissue containing the hippocampus was prepared and hippocampal sagittal slices (350 μ m) were cut using a vibratome (Leica, VT1200S, Germany). Slices were incubated 30 min at 32°C and then allowed to recover for at least one hour at room temperature.

Field Recordings

For electrophysiological recordings, slices were transferred into a recording chamber continuously perfused with aCSF (3 ml/min). A cut between CA3 and CA1 was made to avoid epileptiform activity, due to the presence of picrotoxin (100 μ M) added in aCSF just before recordings. CA3-CA1 areas were identified with differential interference contrast microscopy (Olympus BX50). Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded with a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments, Inc.) using pipettes (3.5-5 M Ω) filled with aCSF and placed in the stratum radiatum of CA1 area, close to the subiculum. Synaptic responses were evoked at 0.5 Hz by orthodromic stimulation (100 μ s) of Schaffer collaterals using a glass pipette, filled with aCSF and placed in the stratum radiatum >200 μ m away from the recording electrodes. LTP was induced by applying a high-frequency stimulation (HFS) protocol consisting of 1 s trains of 100 Hz stimulation repeated four times at 20 s intervals, in current clamp mode. NMDA fEPSPs were recorded in low Mg²⁺ aCSF (0.2mM) with picrotoxin (100 μ M) and 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione (NBQX) (10 μ M) to block GABA_A and AMPA/kainite receptors respectively. LTD was induced using a low-frequency stimulation (LFS) consisting of a train of stimuli given at 1 Hz for 15 minutes. Signals were filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz via a DigiData 1322 interface (Axon Instruments, Inc.). Data were collected and analyzed

using pClamp 9 software (Axon Instruments Inc.). Average fEPSPs traces were obtained from at least 10 min of stable recordings.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Significance was assessed at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using Statistica. For comparison between two groups, Student's t-test was used. For multiple comparisons, a one-way ANOVA followed by Fisher's protected least-significant difference post hoc test was used. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. The frequency distributions were compared using a χ^2 test. Electrophysiological data were compared using Mann Whitney or Wilcoxon test. Symbols used are * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ for Mann Whitney test; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ for Wilcoxon test.

RESULTS

We first performed an anatomopathological evaluation of our colony of 3xTg-AD mice by focusing on the hippocampal formation. We found that A β pathology develops earlier than the tau pathology but with a delayed time course as compared to the original publication (Supplemental figure 1). While intraneuronal A β was already present in 6 month-old 3xTg-AD mice, oligomers and extracellular plaques were detected only in the subiculum of 12 month-old 3xTg-AD mice. Using various Tau antibodies, we found that Tau is conformationally altered and hyperphosphorylated at multiple residues in an age-related manner. As also observed by others (Nelson et al., 2007, Hirata-Fukae et al., 2008), we found that the pathology was significantly more pronounced in female mice compared to age-matched male (Supplemental figure 1). We therefore only used female 3xTg-AD mice at 6-7 month and at 11-12 months of age.

Synaptic dysfunction in the CA1 region of 3xTG-AD mice

The 3xTg-AD mice are characterized by deficits in synaptic plasticity in CA3-CA1 synapses, including long-term potentiation (LTP) that occurs prior to extracellular A β deposition and tangles but is associated with intracellular A β immunoreactivity (Oddo et al., 2003b). We confirmed that the basal glutamatergic transmission is altered as smaller fEPSPs are evoked at CA3-CA1 synapses of 7 month old female 3xTg-AD mice ($n = 8$ in WT and $n = 11$ in 3xTg-AD mice; Figure 1B). Similarly we also observed that high-frequency stimulation (HFS)-induced LTP is impaired in these animals ($156.7\% \pm 6.7$ in WT vs $123.5\% \pm 5.4$ in 3xTg-AD, $p = 0.028$; Figure 1C). Similarly, low-frequency stimulation (LFS)-induced LTD was also reduced in 7 month old female 3xTg-AD mice (20% decrease in WT vs. 15% increase in 3xTg-AD; Figure 1D). Such impairments of synaptic transmission in CA1 were not associated with either the presence of A β plaques or hyperphosphorylated Tau but only with intraneuronal A β as observed using 4G8 and AT8 antibodies (Figure 1E).

No astrocyte reactivity in the CA1 region of 3xTG-AD mice at symptomatic ages

Astrocytes become reactive in many neurodegenerative diseases and display increases in GFAP expression and morphological changes (Ben Haim et al., 2015). Using immunohistochemistry in the CA1 region, we did not detect any change of GFAP expression at both 6 and 12 month of age (Figure 2A). Quantification of individual GFAP-expressing astrocytes using a Sholl analysis (Figure 2B) provided no evidence of morphological changes (Figure 2C) or any detectable cellular hypertrophy (Figure 2D) at the two time-points studied. Those data indicate that symptomatic 3xTg-AD mice do not exhibit any astrocyte reactivity in CA1. Finally, those mice did not show early sign of neuroinflammation since the level of expression of Iba1 was only statistically different compared to control mice at 12 month of age (Figure 1A). Our analysis is consistent with other observations performed at the mRNA level (Zumkehr et al., 2015) and suggests that synaptic deficits occur before overt astrocyte reactivity and neuroinflammation.

3xTg-AD mice display alteration of energy metabolism *in vivo*

We performed an *in vivo* 3D autoradiographic measurement of glucose uptake including a voxel-wise statistical analysis to map the cerebral metabolic differences between WT and 3xTg-AD mice at two time-points. Such an approach allows for an unbiased identification of statistical significance at the voxel level between groups without operator-dependent delineation of regions of interest (Dubois et al., 2010) as it is widely employed for human studies using Statistical Parametric Mapping (SPM). We found that 6 month-old 3xTg-AD mice display localized increases in glucose uptake in the striatum, the auditory cortex and the retrosplenial cortex. Decreases in glucose uptake were observed in the amygdala, the entorhinal cortex and the hippocampus (Figure 3A). Older 3xTg-AD mice display the same hypermetabolic clusters but more hypometabolic clusters in particular in the hippocampus (Figure 3B). Within the hippocampus, the glucose uptake was significantly decreased by 10 to 15% in the CA1, Dentate Gyrus and CA2. These results indicate that 3xTg-AD mice display localized metabolic changes reminiscent to what is observed in AD patients. In the brain, glucose is mainly transported into astrocytes and processed via aerobic glycolysis (Magistretti and Allaman, 2015). We next investigated whether the glycolytic flux was altered in astrocytes of 3xTg-AD mice.

Glycolytic flux in astrocytes from 3xTg-AD mice

Laconic FRET on going

Pfkfb3 immunoblotting on going

Alteration of the production of L- and D-serine in 3xTg-AD mice

D-serine is generated from L-serine via the serine racemase (SRR). L-serine is synthesized only in astrocytes through diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) into the phosphorylated pathway. The first committed step in this pathway is the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate by the specific astrocytic enzyme 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH). We then determined whether the expression of both SRR and PHGDH was altered in the CA1 region of 6 month-old 3xTg-AD mice. Using specific antibodies and confocal microscopy we first confirmed that SRR is not significantly expressed into astrocytes and microglia in CA1 while PHGDH is almost exclusively expressed by astrocytes and by few microglial cells albeit at a lower level (Figure 4A, C). Using RT-qPCR and immunoblotting, we observed that the level of expression of *srr* and *phgdh* was not significantly different between control and 3xTg-AD mice (Figure 4B, D). We took advantage of our Sholl analysis performed on individual astrocytes to probe whether the expression of PHGDH could be locally altered in the CA1 region of 3xTg-AD mice. When the level of PHGDH immunofluorescence was calculated on individual astrocytes selected from GFAP stack images, we found that the distribution of PHGDH expression was significantly different between control and 3xTg-AD mice (Figure 5A, B). While 16% of control astrocytes expressed PHGDH at a value above 120, this percentage is only of 4% in 3xTg-AD astrocytes. There was no correlation between the level of PHGDH expression and the ramification index or the astrocytic surface (data not shown), indicating that PHGDH expression is not influenced by the state of astrocyte reactivity. These rather limited changes in PHGDH expression translated into significant functional changes since the concentration of L-serine was significantly lower in 3xTg-AD mice (~50%), while the concentration of D-serine was significantly higher (more than doubled) (Figure 5C). As a consequence, the ratio of L- to D-serine was significantly lower in 3xTg-AD mice therefore supporting the hypothesis of a defective (probably metabolically-driven) astrocytic phosphorylated pathway.

Restoration of synaptic plasticity by D-serine

Our data point to a possible impairment of D-serine metabolism in 3xTg-AD mice. D-serine is an endogenous co-agonist of synaptic NMDA receptors in many structures including the hippocampus (Henneberger et al., 2010, Papouin et al., 2012). As such, it plays a crucial role in NMDA-dependent plasticity (Henneberger et al., 2010). Considering the role played by D-serine in NMDAR activation, we next tested whether impairments in hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity in female 3xTg-AD mice could be related to a deficit in synaptic D-serine. We recorded the NMDAR component of field excitatory post-synaptic potentials (NMDAR-fEPSPs) that was isolated by reducing extracellular Mg^{2+} to relieve the voltage-dependent inhibition of NMDAR and by blocking GABA and AMPA/kainate receptors with picrotoxin (100 μM) and NBQX (10 μM), respectively. Bath application of D-serine (50 μM) induced an increase of NMDA-fEPSPs ($123.9\% \pm 5.6$, $n=10$, $p=0.002$; Figure 6A). This is in agreement with previous work (Papouin et al., 2012) indicating that the level of occupancy of the co-agonist binding sites of synaptic NMDARs in this region was not fully saturated under control conditions. Importantly, D-serine-mediated increase in synaptic NMDAR-fEPSPs was more important in 3xTg-AD mice ($151.2\% \pm 8.3$, $p=0.0078$, $n=8$; Figure 6A) thereby revealing that the level of occupancy of the glycine-binding site of NMDAR was significantly reduced in 3xTg-AD mice ($p=0.0085$). Such results could explain the deficit in LTP and LTD observed in 3xTg mice since less NMDAR will be available for activation during HFS and LFS. In agreement with this hypothesis, we were able to completely rescue both LTP by supplying exogenous D-serine (50 μM) in slices obtained from 3xTg-AD mice ($163.6\% \pm 9.7$, $n = 6$ in WT vs. $166.1\% \pm 12.4$, $n = 10$ in 3xTg-AD; $p=0.2635$, Figure 6B). Similarly, exogenous D-serine (50 μM) completely rescued LTD in 3xTg-AD mice (87% in WT vs. 78% in 3xTg-AD; $p=$, Figure 6C).

DISCUSSION

Despite compelling experimental evidence that aberrant neural network activity and dysfunction of synapses are the main substrates of cognitive decline in AD, the link between A β and memory impairments remains controversial. We show that early altered cerebral glucose metabolism, an invariant pathophysiological feature of AD, can directly contribute to the synaptic deficits underlying the cognitive decline. We found that in 3xTg-AD mice, such reduction of glucose availability leads to a decrease in the production of L-serine into astrocytes, an essential precursor of D-serine, a physiological ligand of the co-agonist site of synaptic NMDA receptors that is required to sustain synaptic transmission. We also found that this alteration of serine metabolism significantly contributes to the deficit of LTP observed at CA3-CA1 synapses in 3xTg-AD mice.

Using electrophysiological as well as 3D analysis of *in vivo* brain glucose metabolism and histopathology, we observed that 3xTg-AD mice display synaptic dysfunctions (in the CA1 region) and metabolic impairments (in specific brain regions including the hippocampal formation) before any amyloid deposition, inflammation or astrocyte reactivity. Early alterations of cerebral metabolism, as measured using fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) and positron emission tomography (PET), are well established in AD and several studies have shown that abnormalities in FDG-PET can even predict progression from mild cognitive impairment (MCI) to AD (for references see (Cohen and Klunk, 2014)). There is no clear correlation between the retention of Pittsburgh Compound-B (PiB, an *in vivo* amyloid imaging agent) and the uptake of FDG in the cortex of AD patients, supporting the hypothesis that amyloid deposition is not the main determinant of glucose changes. Such metabolic alterations have also been reported in many rodent models of AD including APP, APP/PS1 and 3xTg-AD mice (Niwa et al., 2002, Dubois et al., 2010, Nicholson et al., 2010). As we presently observed, decreases in glucose use were also reported in young transgenic APP mice that do not have amyloid plaques (Niwa et al., 2002). The fact that topical application of A β reduces glucose use in normal mice (Niwa et al., 2000) provides further evidence that A β produces alterations in energy metabolism that are independent of neuropathological changes. Recent data suggest that the endothelial glucose transporter 1 (GLUT1) may represent a molecular target by which A β could exert deleterious metabolic effects (Winkler et al., 2015). In the brain, there exists a metabolic complementarity between astrocytes and neurons. Glucose,

the almost exclusive energy substrate of the brain, is processed glycolytically to produce lactate and pyruvate in astrocytes, while neurons predominantly process glucose through the pentose phosphate pathway to produce NADPH (for review, see (Magistretti and Allaman, 2015)). As a consequence, it is likely that the decreased glucose uptake we observed in 3xTg-AD mice was first translated into a decreased glycolytic flux into astrocytes.

One major function of aerobic glycolysis is to maintain high levels of glycolytic intermediates to support anabolic reactions in cells (Lunt and Vander Heiden, 2011). Glycolytic intermediates are direct precursors for the biosynthesis of some nonessential amino acids since 3-phosphoglycerate (3PG) provides the carbons for glycine and serine. In the adult brain, those reactions (known at the phosphorylated pathway) occur only into astrocytes (Yang et al., 2010). The importance of this pathway is such that homozygous mutations of each of the 3 enzymes responsible for L-serine synthesis (PHGDH, PSAT1 and PSPH) are the cause of a common syndrome called Neu-Laxova, a rare autosomal-recessive disorder characterized by severe peripheral and central malformations (microcephaly) leading to prenatal or early postnatal lethality (Acuna-Hidalgo et al., 2014). We found that the concentration of L-serine was significantly lower in 3xTg-AD mice. Since the expression of PHGDH, the first enzyme of the phosphorylated pathway responsible for the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate was not significantly altered, it is likely that this decrease of L-serine was due to a decreased availability of 3PG to fuel this pathway. L-serine is the main substrate for D-serine synthesis in the brain. We have previously shown that D-serine is an endogenous co-agonist of synaptic NMDA receptors (Papouin et al., 2012) that plays a crucial role in NMDA-dependent plasticity (Henneberger et al., 2010). We then tested the hypothesis that this defective astrocytic phosphorylated pathway contributes to early synaptic deficits in 3xTg-AD mice.

As reported previously in 3xTg-AD and others transgenic mouse models of AD ((Oddo et al., 2003b) and see (Cummings et al., 2015) for references), we observed that the alteration of both the basal glutamatergic transmission and of the LTP precedes plaque deposition in the CA1 region of 3xTg-AD mice. We found that not only the LTP but also the LTD is significantly impaired in 7 month-old 3xTg-AD mice. Those synaptic deficits are not yet observed in 1-2 month-old 3xTg-AD mice (Oddo et al., 2003b) because of compensatory mechanisms involving endoplasmic reticulum (ER) calcium release

(Chakroborty et al., 2009, Chakroborty et al., 2012). We found that exogenous D-serine (50 μ M) completely rescued both forms of synaptic plasticity (LTP and LTD) in 7 month-old female 3xTg-AD mice. These data support the hypothesis that a deficit of L-serine synthesis by astrocytes mediated by a decreased glycolytic flux is responsible for the synaptic alteration mediated by NMDAR in the hippocampus of 3xTg-AD mice. In addition to lactate (Suzuki et al., 2011, Yang et al., 2014), our data suggest that the altered production of another byproduct of aerobic glycolysis (D-serine) may play an important role in the pathophysiology of AD (and perhaps other neurodegenerative diseases). It is interesting to note that D-serine levels in the cerebrospinal fluid might constitute a novel candidate biomarker for early AD diagnosis (Madeira et al., 2015).

FUNDING

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011-34 MALZ-003-02 to G.B. and B.C.), Association France Alzheimer and Fondation de France (Prix Spécial 2012 to G.B., B.C. and S.H.R.O.). J.L.D. is a recipient of a PhD fellowship from the CEA (IRTELIS program).

The team of G.B. is part of the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP) training network.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mylène Guérif and Marianne Maugard for useful technical help and Dr. Felipe Barros for useful discussion.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

LEGENDS TO FIGURES

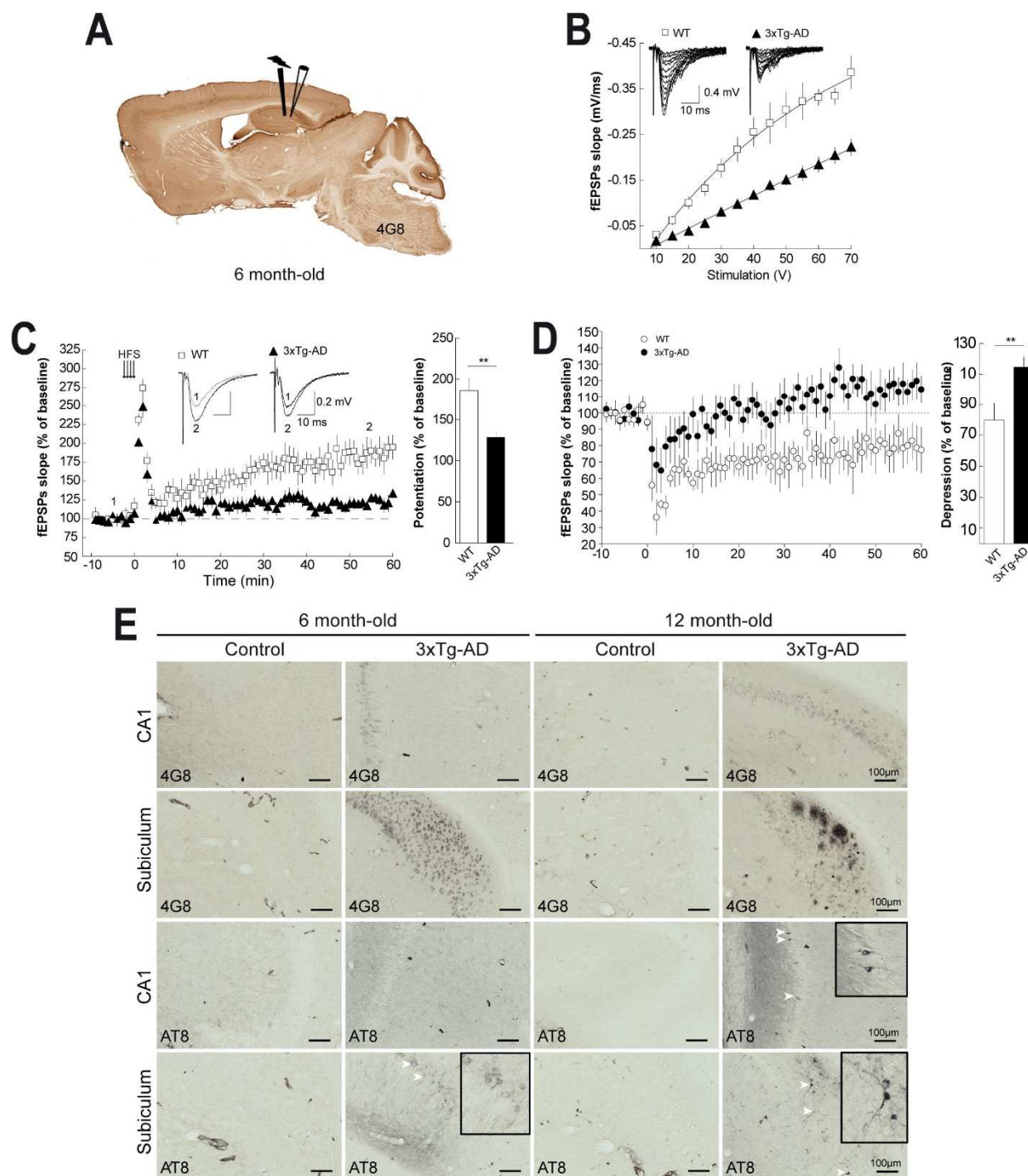


Figure 1. Deficit of synaptic plasticity at CA3-CA1 synapses in female 3xTg-AD mice

(A) Tangential brain section of a 6 month-old 3xTg-AD mouse immunostained with 4G8 indicating the locations of the stimulating and recording electrodes in the CA1 region at a time when only intraneuronal

A β is present in the cortex and in the hippocampal formation. **(B)** Traces (average of 3 sweeps) are representative fEPSPs. Input/output curves in WT (white circles) and 3xTg-AD mice (black triangles) reveal that basal glutamatergic synaptic transmission was impaired in 3xTg-AD mice. **(C)** Traces represent characteristic fEPSPs evoked before (1) and after (2) LTP induction. LTP was significantly impaired in 3xTg-AD mice. **(D)** Traces represent characteristic fEPSPs evoked before and after LTD induction. LTD was significantly impaired in 3xTg-AD mice. **(E)** Such impairments of synaptic transmission in CA1 was not associated with either the presence of A β plaques or hyperphosphorylated Tau but only with intraneuronal A β as observed using 4G8 and AT8 antibodies.

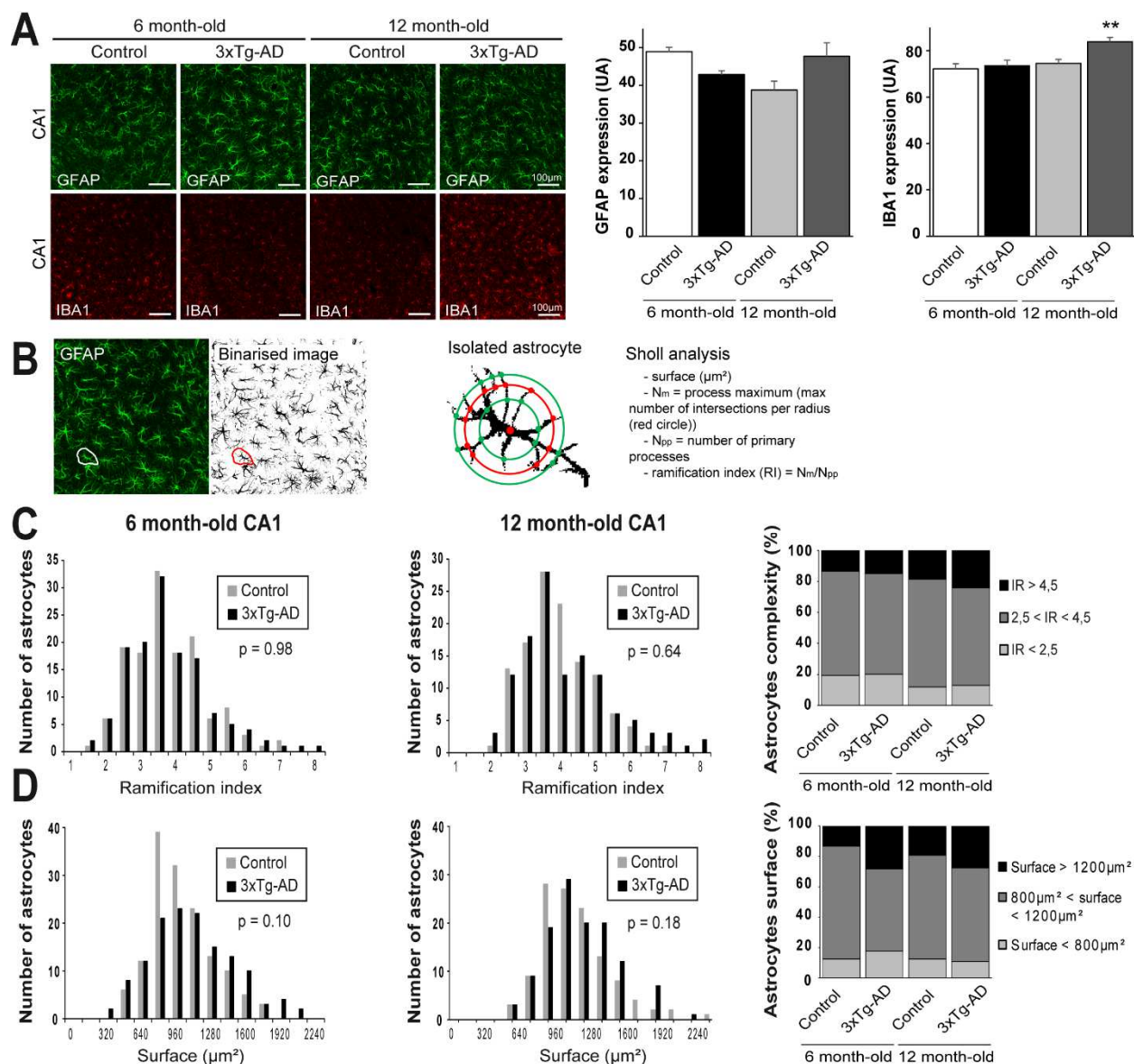


Figure 2. No astrocyte reactivity in the CA1 region of 3xTG-AD mice

(A) Immunofluorescent staining of 6 and 12 month-old control and 3xTg-AD brain mice using GFAP and IBA1 antibodies. The global expression of GFAP as quantified using ImageJ was not changed in the CA1 region at both ages. The expression of IBA1 was significantly higher only in 12 month-old 3xTg-AD mice. (One-way ANOVA $**p < 0.01$) (B) Illustration of the Sholl analysis performed on a binarised image taken from a GFAP immunostaining. Astrocytes were manually outlined and the Sholl analysis was performed using ImageJ. The Sholl analysis generates several parameters such as the surface, the N_m (process maximum) and the ramification index (RI) for each analyzed cell. Astrocytes of 6 month-old (control $n=136$, 3xTg-AD $n=135$) and 12 month-old (control $n=120$, 3xTg-AD $n=120$) mice were analyzed using the Sholl analysis. (C,D) The distribution of the ramification index and of the surface was similar

for all groups (Khi² test), indicating that astrocytes are not reactive in the CA1 region of 6 and 12 month-old 3xTg-AD mice.

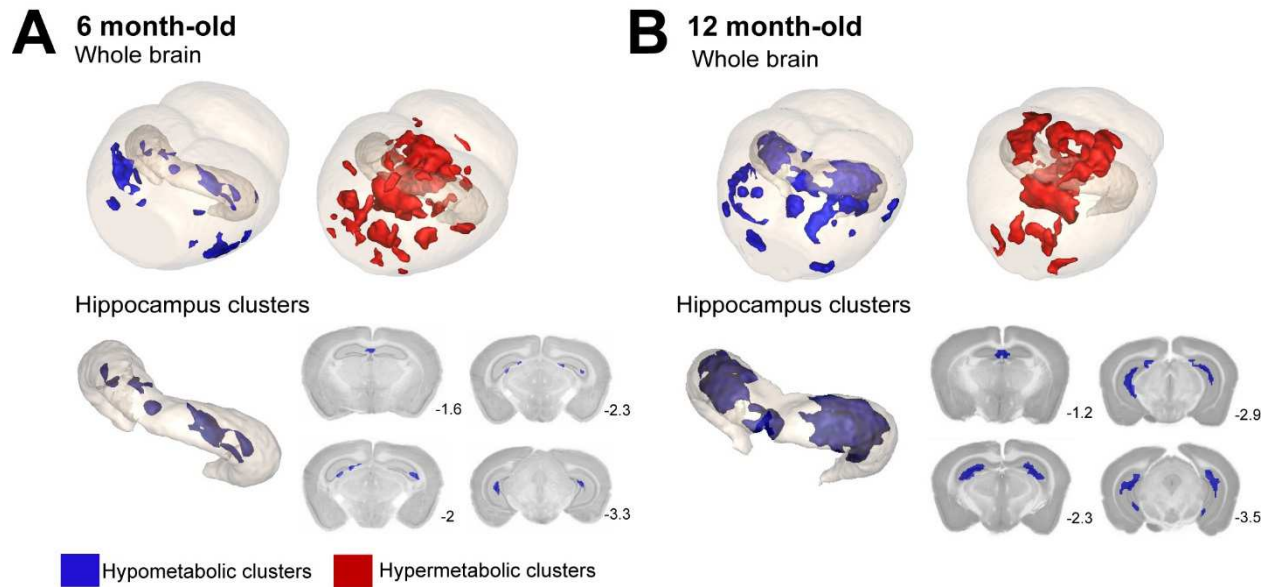


Figure 3. 3xTG-AD mice display energy metabolism alterations in vivo

In vivo glucose uptake was measured following 3D-reconstructed autoradiography and voxel-wise statistical analysis to map the cerebral metabolic differences between **(A)** 6 month-old control (n=10) and 3xTg-AD (n=10) and **(B)** between 12 month-old control (n=9) and 3xTg-AD mice (n=10). Brains of 3xTg-AD mice display hypometabolic and hypermetabolic clusters at both ages. Only hypometabolic clusters were observed in the hippocampus and their size were larger in 12 month-old 3xTg-AD mice (Student's t test *p<0.05). Numbers indicate the anatomical position relative to Bregma.

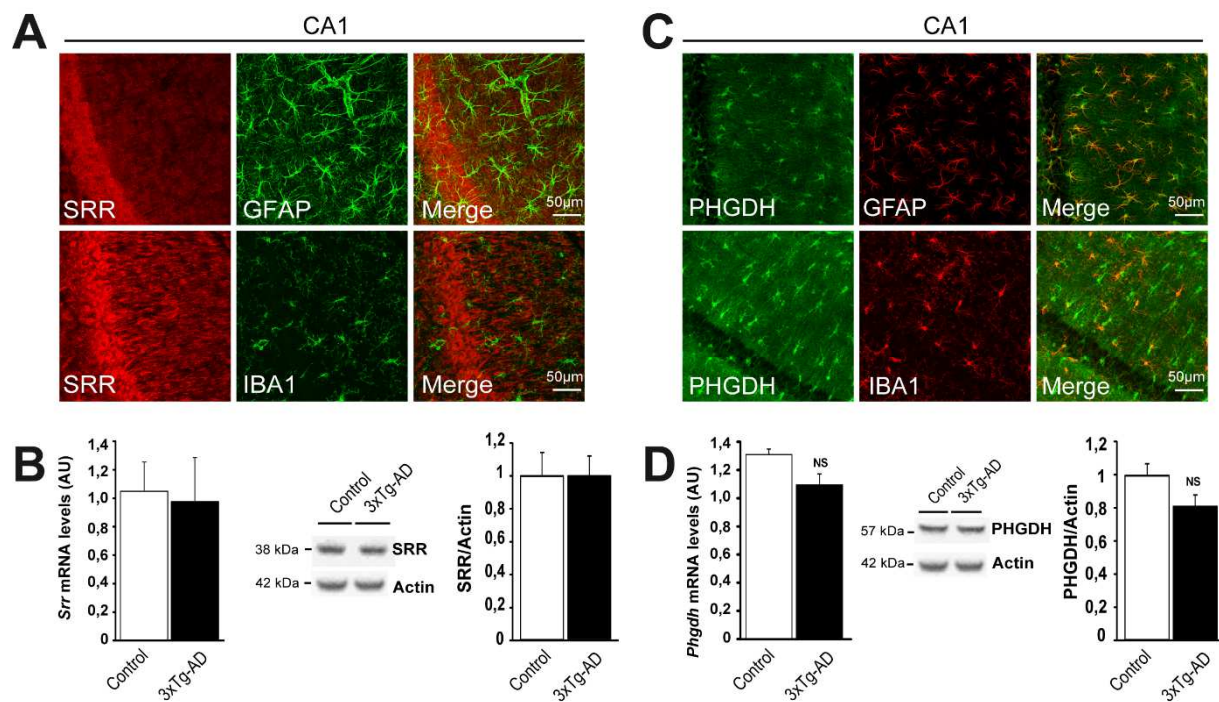


Figure 4. Expression of SRR and of PHGDH is not significantly altered in 3xTg-AD mice

(A) Double immunofluorescent staining of brain sections from 6 month-old control mice using SRR (red) and either an astrocyte marker (GFAP, green) or a microglial marker (IBA1, green). (B) Quantification of RT-qPCR data for SRR mRNA in control (n=5) and 3xTg-AD (n=10) mice (NS, Student's t test, $p=0.87$) and immunoblotting for SRR in the CA1 and quantification in 6 month-old 3xTg-AD (n=7) and control (n=6) mice (NS, Student's t test, $p=0.47$). (C) Double immunofluorescent staining of brain sections from 6 month-old control mice using PHGDH (red) and either an astrocyte marker (GFAP, green) or a microglial marker (IBA1, green). (D) Quantification of RT-qPCR data for PHGDH mRNA in control (n=5) and 3xTg-AD (n=10) mice (NS, Student's t test, $p=0.09$) and immunoblotting for PHGDH in the CA1 and quantification in 6 month-old 3xTg-AD (n=7) and control (n=6) mice (NS, Student's t test, $p=0.62$).

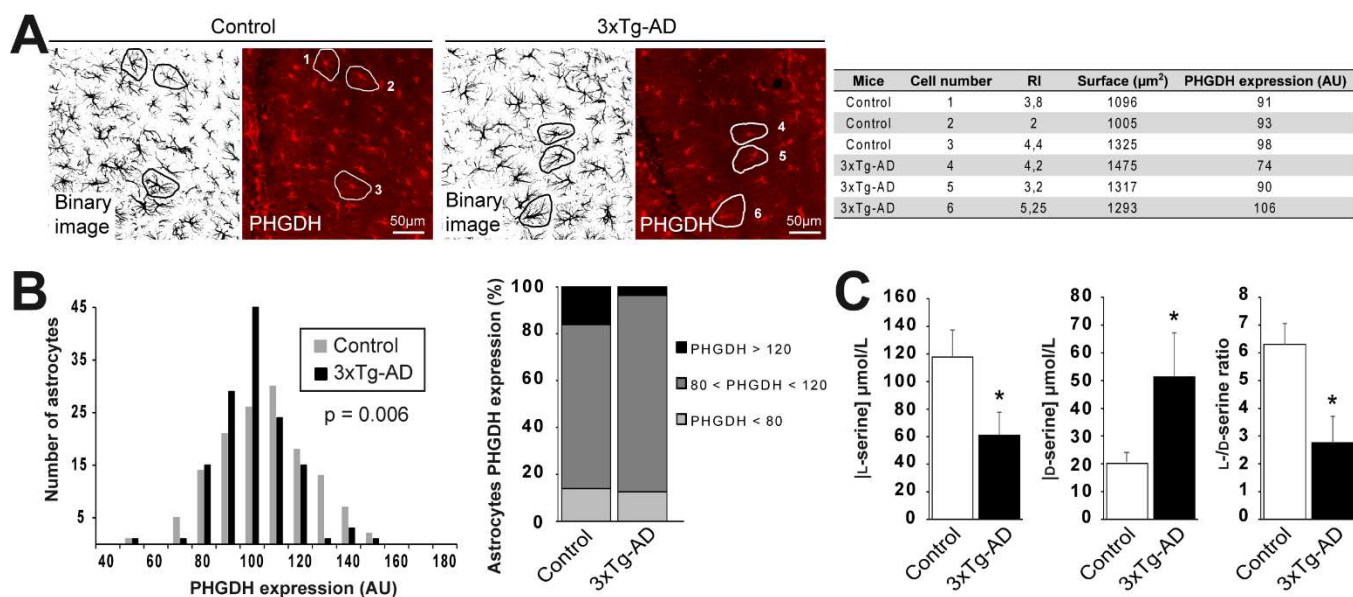


Figure 5. Metabolism of L- and D-serine is altered in 3xTg-AD mice

(A) Quantification of PHGDH expression in individual astrocytes isolated during the Sholl analysis. Values (ramification index RI, surface and PHGDH expression) obtained in 3 astrocytes from a control and a 3xTg-AD mouse CA1 region. (B) Graph bars showing the differential distribution of the PHGDH expression among the astrocytic population of the CA1 region in control (n=136) and 3xTg-AD mice (n=135); χ^2 test, **p<0.01. (C) Concentration of L- and D-serine in the hippocampus of 6 month-old control (n=10) and 3xTg-AD mice (n=7); Student's t test *p<0.05.

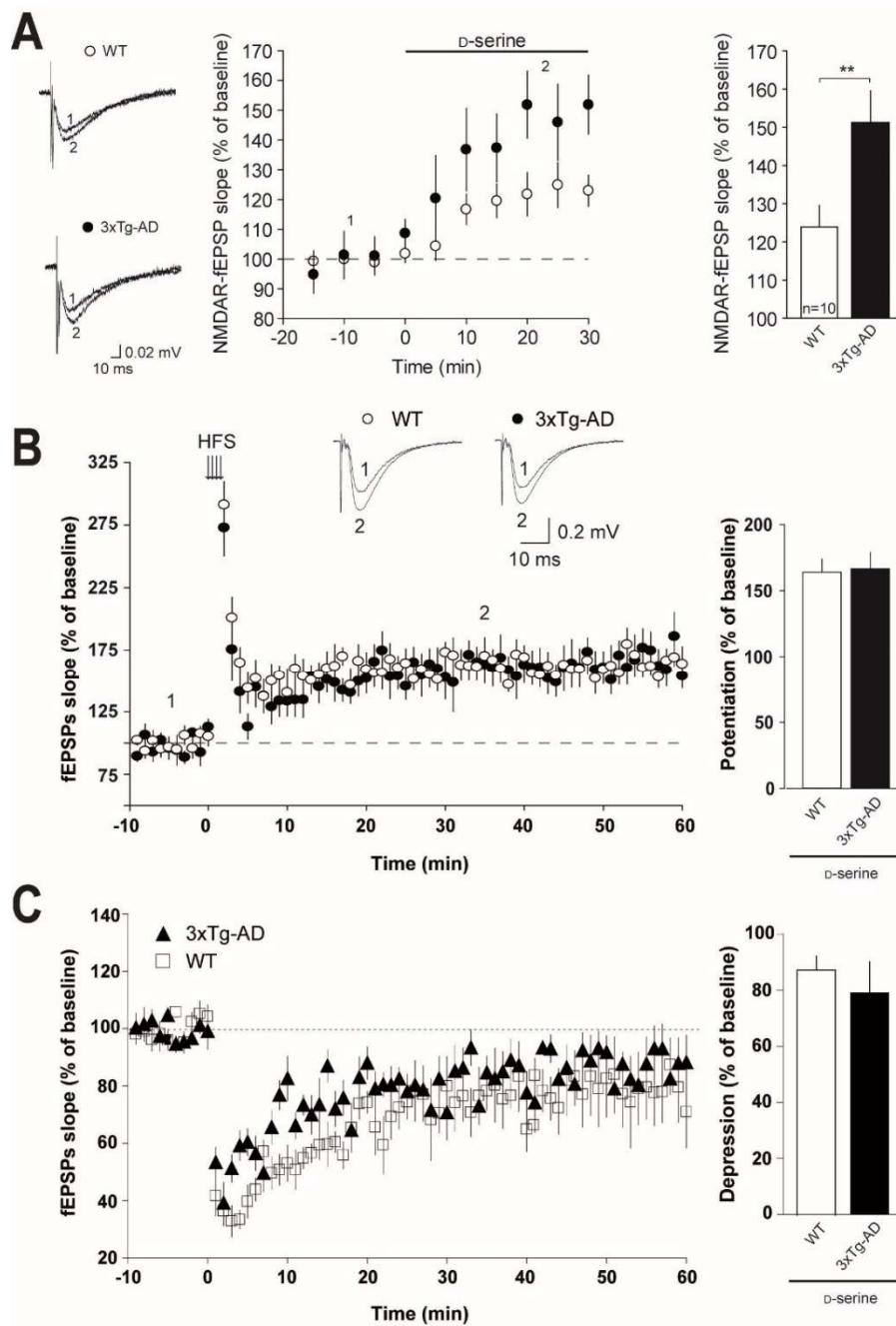
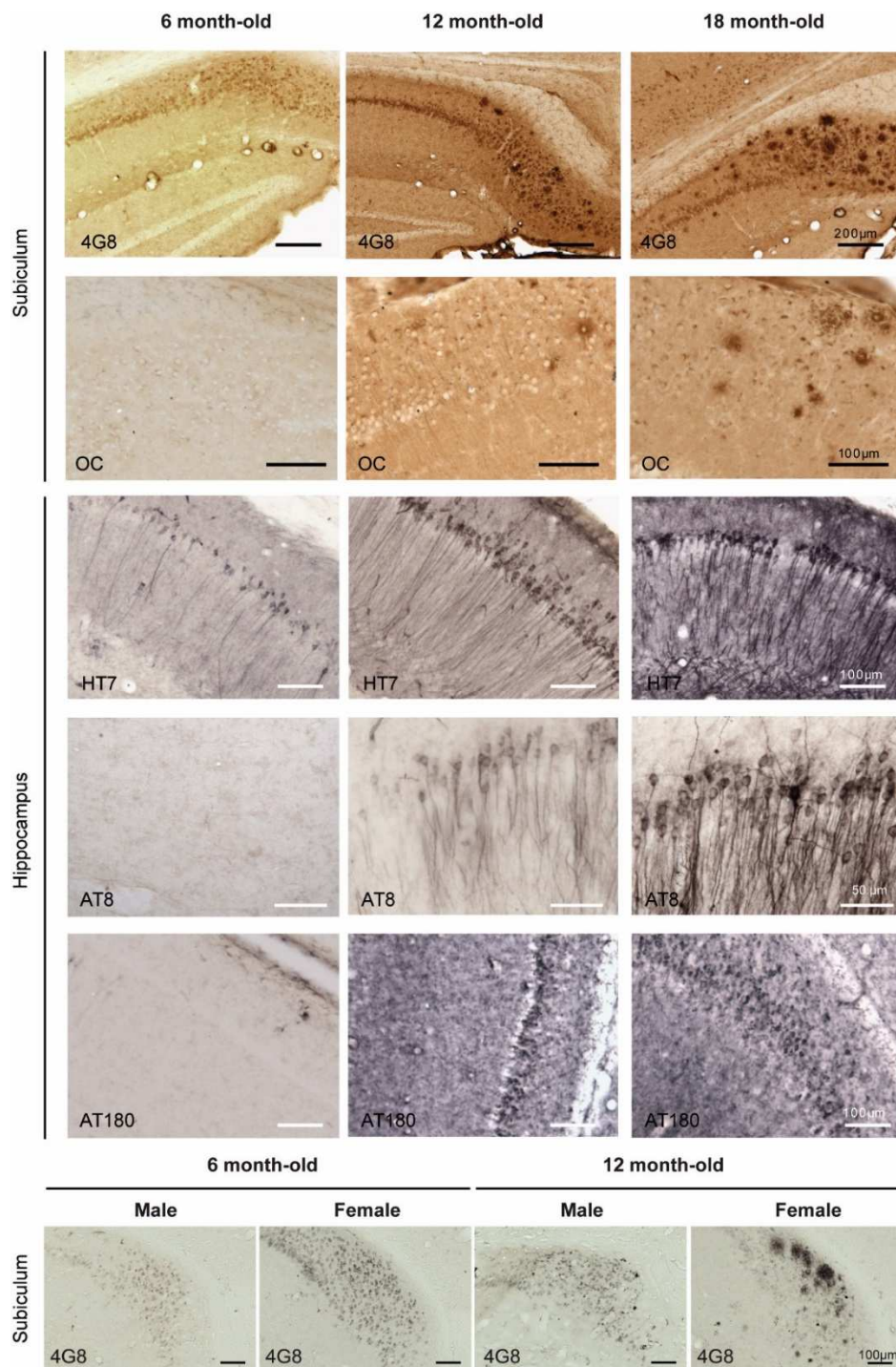


Figure 6. Deficits in LTP and LTD in 3xTg-AD mice are due to a decrease of D-serine availability

(A) Traces are representative NMDAR-fEPSPs recorded before (1) and during (2) D-serine application (50 μ M). Bar graph summarizing results presented in (A) indicates that the NMDAR co-agonist binding site occupancy was decreased in 3xTg-AD mice. (B) D-serine application (50 μ M) rescued LTP in 3xTg-AD mice. Bar graph summarizing experiments presented in B. (C) D-serine application (50 μ M) rescued LTD in 3xTg-AD mice. Bar graph summarizing experiments presented in C. Results are presented as means \pm SEM for fEPSPs measured 50-60 minutes after HFS or LFS relative to baseline. ** $p < 0.01$ (Mann Whitney test).



Supplemental figure 1. Histological characterization at different age and sex-relative AD progression in the 3xTg-AD mouse model.

Tangential brain section of a 6, 12 and 18 month-old 3xTg-AD mouse immunostained with 4G8 or OC indicating the progression of the amyloid pathology among time in this mouse model. Tangential brain section of a 6, 12 and 18 month-old 3xTg-AD mouse immunostained with HT7, AT8 or AT180 indicating the progression of the tau pathology among time in this mouse model. Tangential brain section of a 6

and 12 month-old 3xTg-AD male and female mouse immunostained with 4G8 showing a more aggressive AD phenotype in the female compared to the male in the 3xTg-AD mouse model.

REFERENCES ARTICLE

- Acuna-Hidalgo R, Schanze D, Kariminejad A, Nordgren A, Kariminejad MH, Conner P, Grigelioniene G, Nilsson D, Nordenskjold M, Wedell A, Freyer C, Wredenberg A, Wieczorek D, Gillesen-Kaesbach G, Kayserili H, Elcioglu N, Ghaderi-Sohi S, Goodarzi P, Setayesh H, van de Vorst M, Steehouwer M, Pfundt R, Krabichler B, Curry C, MacKenzie MG, Boycott KM, Gilissen C, Janecke AR, Hoischen A, Zenker M (2014) Neu-Laxova syndrome is a heterogeneous metabolic disorder caused by defects in enzymes of the L-serine biosynthesis pathway. *American journal of human genetics* 95:285-293.
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C (2015) Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:278.
- Chakroborty S, Goussakov I, Miller MB, Stutzmann GE (2009) Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:9458-9470.
- Chakroborty S, Kim J, Schneider C, Jacobson C, Molgo J, Stutzmann GE (2012) Early presynaptic and postsynaptic calcium signaling abnormalities mask underlying synaptic depression in presymptomatic Alzheimer's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:8341-8353.
- Chen Z, Zhong C (2013) Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol* 108:21-43.
- Cohen AD, Klunk WE (2014) Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiology of disease* 72 Pt A:117-122.
- Cummings DM, Liu W, Portelius E, Bayram S, Yasvoina M, Ho SH, Smits H, Ali SS, Steinberg R, Pegasiou CM, James OT, Matarin M, Richardson JC, Zetterberg H, Blennow K, Hardy JA, Salih DA, Edwards FA (2015) First effects of rising amyloid-beta in transgenic mouse brain: synaptic transmission and gene expression. *Brain : a journal of neurology* 138:1992-2004.
- Dubois A, Herard AS, Delatour B, Hantraye P, Bonvento G, Dhenain M, Delzescaux T (2010) Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 51:586-598.
- Ehmsen JT, Ma TM, Sason H, Rosenberg D, Ogo T, Furuya S, Snyder SH, Wolosker H (2013) D-serine in glia and neurons derives from 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:12464-12469.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:101-112.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
- Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, LaFerla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y (2008) Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain research* 1216:92-103.

- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *PNAS* 95:6448-6453.
- Lorenzo MP, Villasenor A, Ramamoorthy A, Garcia A (2013) Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: application to bipolar disorder study. *Electrophoresis* 34:1701-1709.
- Lunt SY, Vander Heiden MG (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology* 27:441-464.
- Madeira C, Lourenco MV, Vargas-Lopes C, Suemoto CK, Brandao CO, Reis T, Leite RE, Laks J, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, Grinberg LT, Ferreira ST, Panizzutti R (2015) d-serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development. *Transl Psychiatry* 5:e561.
- Magistretti PJ, Allaman I (2015) A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86:883-901.
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ (2010) Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 20:843-854.
- Nelson RL, Guo Z, Halagappa VM, Pearson M, Gray AJ, Matsuoka Y, Brown M, Clark RF, Mattson MP (2007) Prophylactic Treatment with Paroxetine Ameliorates Behavioral Deficits and Retards the Development of Amyloid and Tau Pathologies in 3xTgAD Mice. *Exp Neurol* 201:166-176.
- Nicholson RM, Kusne Y, Nowak LA, LaFerla FM, Reiman EM, Valla J (2010) Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain research* 1347:179-185.
- Niwa K, Carlson GA, Iadecola C (2000) Exogenous A β 31-40 Reproduces Cerebrovascular Alterations Resulting From Amyloid Precursor Protein Overexpression in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 20:1659-1668.
- Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C (2002) Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiology of disease* 9:61-68.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39:409-421.
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Sholl DA (1953) Dendritic Organization in the Neurons of the Visual and Motor Cortices of the Cat. *Journal of Anatomy* 87:387-406.
- Spires-Jones TL, Hyman BT (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82:756-771.
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810-823.
- Tu S, Okamoto SI, Lipton SA, Xu H (2014) Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* 9:1-12.
- Vlasko AG, Vaishnavi SN, Couture L, Sacco D, Shannon BJ, Mach RH, Morris JC, Raichle ME, Mintun MA (2010) Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid-beta (A β) deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:17763-17767.
- Winkler EA, Nishida Y, Sagare AP, Rege SV, Bell RD, Perlmutter D, Sengillo JD, Hillman S, Kong P, Nelson AR, Sullivan JS, Zhao Z, Meiselman HJ, Wenby RB, Soto J, Abel ED, Makshanoff J,

- Zuniga E, De Vivo DC, Zlokovic BV (2015) GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature neuroscience* 18:521-530.
- Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M (2001) 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase, a Key Enzyme for L-Serine Biosynthesis, Is Preferentially Expressed in the Radial Glia/Astrocyte Lineage and Olfactory Ensheathing Glia in the Mouse Brain. *The journal of Neuroscience* 21:7691-7704.
- Yang J, Ruchti E, Petit JM, Jourdain P, Grenningloh G, Allaman I, Magistretti PJ (2014) Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *PNAS* 111:12228-12233.
- Yang JH, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita MO, Tomonaga S, Azuma N, Watanabe M, Hamase K, Zaitu K, Machida T, Messing A, Itohara S, Hirabayashi Y, Furuya S (2010) Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *The Journal of biological chemistry* 285:41380-41390.
- Zumkehr J, Rodriguez-Ortiz CJ, Cheng D, Kieu Z, Wai T, Hawkins C, Kilian J, Lim SL, Medeiros R, Kitazawa M (2015) Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 36:2260-2271.

E. Références

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience* 7:41-53.
- Abe T, Suzuki M, Sasabe J, Takahashi S, Unekawa M, Mashima K, Iizumi T, Hamase K, Konno R, Aiso S, Suzuki N (2014) Cellular origin and regulation of D- and L-serine in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34:1928-1935.
- Abramov AY, Canevari L, Duchen MR (2003) Changes in Intracellular Calcium and Glutathione in Astrocytes as the Primary Mechanism of Amyloid Neurotoxicity. *The journal of Neuroscience* 23:5088-5095.
- Acuna-Hidalgo R, Schanze D, Kariminejad A, Nordgren A, Kariminejad MH, Conner P, Grigelioniene G, Nilsson D, Nordenskjöld M, Wedell A, Freyer C, Wredenberg A, Wieczorek D, Gillessen-Kaesbach G, Kayserili H, Elcioglu N, Ghaderi-Sohi S, Goodarzi P, Setayesh H, van de Vorst M, Steehouwer M, Pfundt R, Krabichler B, Curry C, MacKenzie MG, Boycott KM, Gilissen C, Janecke AR, Hoischen A, Zenker M (2014) Neu-Laxova syndrome is a heterogeneous metabolic disorder caused by defects in enzymes of the L-serine biosynthesis pathway. *American journal of human genetics* 95:285-293.
- Agulhon C, Fiacco TA, McCarthy KD (2010) Hippocampal Short- and Long-Term Plasticity Are Not Modulated by Astrocyte Ca²⁺ Signaling. *Science* 327:1250-1254.
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ (2011) Astrocyte–neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences* 34:76-87.
- Allaman I, Gavillet M, Belanger M, Laroche T, Viertl D, Lashuel HA, Magistretti PJ (2010) Amyloid-beta Aggregates Cause Alterations of Astrocytic Metabolic Phenotype: Impact on Neuronal Viability. *The journal of Neuroscience* 30:3326-3338.
- Alvarez JL, Katayama T, Prat A (2013) Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61:1939-1958.
- Angelova PR, Abramov AY (2014) Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of Abeta-induced neurotoxicity. *Biochemical Society transactions* 42:1286-1290.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728-739.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences* 22:208-215.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468:232-243.
- Balan L, Foltyn VN, Zehl M, Dumin E, Dikopoltsev E, Knoh D, Ohno Y, Kihara A, Jensen ON, Radziszewsky IS, Wolosker H (2009) Feedback inactivation of D-serine synthesis by NMDA receptor-elicited translocation of serine racemase to the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:7589-7594.
- Barros LF, San Martín A, Sotelo-Hitschfeld T, Lerchundi R, Fernandez-Moncada I, Ruminot I, Gutierrez R, Valdebenito R, Ceballo S, Alegria K, Baeza-Lehnert F, Espinoza D (2013) Small is fast: astrocytic glucose and lactate metabolism at cellular resolution. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:27.
- Beach TG, Walker R, McGeer EG (1989) Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 2:420-436.
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C (2015) Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:278.
- Benesova J, Hock M, Butenko O, Prajerova I, Anderova M, Chvatal A (2009) Quantification of astrocyte volume changes during ischemia in situ reveals two populations of astrocytes in the cortex of GFAP/EGFP mice. *Journal of neuroscience research* 87:96-111.
- Benneyworth MA, Li Y, Basu AC, Bolshakov VY, Coyle JT (2012) Cell selective conditional null mutations of serine racemase demonstrate a predominate localization in cortical glutamatergic neurons. *Cellular and molecular neurobiology* 32:613-624.
- Berger A, Lorain S, Josephine C, Desrosiers M, Peccate C, Voit T, Garcia L, Sahel JA, Bemelmans AP (2015) Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23:918-930.

- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, Wold JF, Roe AT, Stranna A, Santello M, Bouvier D, Ottersen OP, Volterra A, Gundersen V (2012) Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb Cortex* 22:1690-1697.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The Distribution of Tau in the Mammalian Central Nervous System. *The Journal of cell biology* 101:1371-1378.
- Bittner CX, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Gutierrez R, Cordova A, Valdebenito R, Frommer WB, Barros LF (2010) High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics* 2.
- Bolanos JP, Almeida A, Moncada S (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in biochemical sciences* 35:145-149.
- Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M, Hauser DL (1989) Neurofibrillary Degeneration and Neuronal Loss in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging* 10:709-715.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82:239-259.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Abnormal Tau Phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's Disease Recapitulates Development and Contributes to Reduced Microtubule Binding. *Neuron* 10:1089-1099.
- Bribian A, Figueres-Onate M, Martin-Lopez E, Lopez-Mascaraque L (2015) Decoding astrocyte heterogeneity: New tools for clonal analysis. *Neuroscience*.
- Brito-Moreira J, C. Paula-Lima A, R. Bomfim T, F. Oliveira F, J. Sepulveda F, G. De Mello F, G. Aguayo L, Panizzutti R, T. Ferreira S (2011) A-beta Oligomers Induce Glutamate Release from Hippocampal Neurons. *Current Alzheimer Research* 8:552-562.
- Bröer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Bröer S (1999) The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *Journal of neurochemistry* 73:2184-2194.
- Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.
- Brown JM, Hunihan L, Prack MM, Harden DG, Bronson J, Dzierba CD, Gentles RG, Hendricson A, Krause R, Macor JE, Westphal RS (2014) In vitro Characterization of a small molecule inhibitor of the alanine serine cysteine transporter -1 (SLC7A10). *Journal of neurochemistry* 129:275-283.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *The journal of Neuroscience* 22:183-192.
- Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ (2007) Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:13357-13365.
- Carroll JC, Rosario ER, Kreimer S, Villamagna A, Gentzsch E, Stanczyk FZ, Pike CJ (2010) Sex differences in beta-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain research* 1366:233-245.
- Chakroborty S, Goussakov I, Miller MB, Stutzmann GE (2009) Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:9458-9470.
- Chakroborty S, Kim J, Schneider C, Jacobson C, Molgo J, Stutzmann GE (2012) Early presynaptic and postsynaptic calcium signaling abnormalities mask underlying synaptic depression in presymptomatic Alzheimer's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:8341-8353.
- Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin AC, Maddocks OD, Chokkathukalam A, Coyle JE, Jankevics A, Holding FP, Vousden KH, Frezza C, O'Reilly M, Gottlieb E (2012) Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* 491:458-462.
- Chen KH, Reese EA, Kim HW, Rapoport SI, Rao JS (2011) Disturbed neurotransmitter transporter expression in Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 26:755-766.
- Chen Y, Tian Z, Liang Z, Sun S, Dai C-L, Lee MH, LaFerla FM, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong C-X (2012) Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7.

- Chen Z, Zhong C (2013) Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol* 108:21-43.
- Choi Hyun B, Gordon Grant RJ, Zhou N, Tai C, Rungta Ravi L, Martinez J, Milner Teresa A, Ryu Jae K, McLarnon James G, Tresguerres M, Levin Lonny R, Buck J, MacVicar Brian A (2012) Metabolic Communication between Astrocytes and Neurons via Bicarbonate-Responsive Soluble Adenylyl Cyclase. *Neuron* 75:1094-1104.
- Cleveland DW, Hwo S-Y, Kirschner MW (1977) Physical and Chemical Properties of Purified Tau Factor and the Role of Tau in Microtubule Assembly. *Journal of Molecular Biology* 116:227-247.
- Cohen AD, Klunk WE (2014) Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiology of disease* 72 Pt A:117-122.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science* 261:921-923.
- Cummings DM, Liu W, Portelius E, Bayram S, Yasvoina M, Ho SH, Smits H, Ali SS, Steinberg R, Pegasiou CM, James OT, Matarin M, Richardson JC, Zetterberg H, Blennow K, Hardy JA, Salih DA, Edwards FA (2015) First effects of rising amyloid-beta in transgenic mouse brain: synaptic transmission and gene expression. *Brain : a journal of neurology* 138:1992-2004.
- Damseh N, Simonin A, Jallas C, Picoraro JA, Shaag A, Cho MT, Yaacov B, Neidich J, Al-Ashhab M, Juusola J, Bale S, Telegrafi A, Retterer K, Pappas JG, Moran E, Cappell J, Anyane Yeboa K, Abu-Libdeh B, Hediger MA, Chung WK, Elpeleg O, Edvardson S (2015) Mutations in SLC1A4, encoding the brain serine transporter, are associated with developmental delay, microcephaly and hypomyelination. *Journal of medical genetics* 52:541-547.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *The Journal of biological chemistry* 282:11590-11601.
- de la Monte SM (1989) Quantitation of cerebral atrophy in preclinical and end-stage Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 25:450-459.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science* 121:2115-2122.
- des Rosiers MH, Sakurada O, Jehle J, Shinohara M, Kennedy C, Sokoloff L (1978) Functional plasticity in the immature striate cortex of the monkey shown by the [¹⁴C]deoxyglucose method. *Science* 200:447-449.
- DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J (1998) Astrocytes Regulate Microglial Phagocytosis of Senile Plaque Cores of Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology* 140:329-340.
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, Tiret P, Volterra A (2011) Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature neuroscience* 14:1276-1284.
- Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P (1995) Correlations of Synaptic and Pathological Markers With Cognition of the Elderly. *Neurobiology of Aging* 16:285-304.
- Do TM, Alata W, Dodacki A, Traversy MT, Chacun H, Pradier L, Scherrmann JM, Farinotti R, Calon F, Bourasset F (2014) Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 81:311-317.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica* 30:379-387.
- Doyle JP, Dougherty JD, Heiman M, Schmidt EF, Stevens TR, Ma G, Bupp S, Shrestha P, Shah RD, Doughty ML, Gong S, Greengard P, Heintz N (2008) Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135:749-762.
- Dubois A, Hérard A-S, Flandin G, Duchesnay E, Besret L, Frouin V, Hantraye P, Bonvento G, Delzescaux T (2008) Quantitative validation of voxel-wise statistical analyses of autoradiographic rat brain volumes: Application to unilateral visual stimulation. *NeuroImage* 40:482-494.
- Dubois A, Herard AS, Delatour B, Hantraye P, Bonvento G, Dhenain M, Delzescaux T (2010) Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose

- uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 51:586-598.
- Ehmsen JT, Ma TM, Sason H, Rosenberg D, Ogo T, Furuya S, Snyder SH, Wolosker H (2013) D-serine in glia and neurons derives from 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:12464-12469.
- El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD (2007) Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13:432-438.
- Emsley JG, Macklis JD (2006) Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biology* 175-186.
- Engl E, Attwell D (2015) Non-signalling energy use in the brain. *The Journal of physiology* 593:3417-3429.
- Escartin C, Rouach N (2013) Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Frontiers in Neuroenergetics* 5.
- Fang H, Zhang LF, Meng FT, Du X, Zhou JN (2010) Acute hypoxia promote the phosphorylation of tau via ERK pathway. *Neuroscience letters* 474:173-177.
- Feany MB, Dickson DW (1995) Widespread cytoskeletal pathology characterizes corticobasal degeneration. *The American journal of pathology* 146:1388-1396.
- Fehr M, Lalonde S, Lager I, Wolff MW, Frommer WB (2003) In vivo imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *The Journal of biological chemistry* 278:19127-19133.
- Filosa JA, Morrison HW, Iddings JA, Du W, Kim KJ (2015) Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience*.
- Foltyn VN, Bendikov I, De Miranda J, Panizzutti R, Dumin E, Shleper M, Li P, Toney MD, Kartvelishvili E, Wolosker H (2005) Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an alpha,beta-elimination activity. *The Journal of biological chemistry* 280:1754-1763.
- Fu W, Shi D, Westaway D, Jhamandas JH (2015) Bioenergetic mechanisms in astrocytes may contribute to amyloid plaque deposition and toxicity. *The Journal of biological chemistry* 290:12504-12513.
- Fujita T, Chen MJ, Li B, Smith NA, Peng W, Sun W, Toner MJ, Kress BT, Wang L, Benraiss A, Takano T, Wang S, Nedergaard M (2014) Neuronal transgene expression in dominant-negative SNARE mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:16594-16604.
- Furuya S (2008) An essential role for de novo biosynthesis of L-serine in CNS development. *Asia Pac J Clin Nutr* 17:312-315.
- Furuya S, Yoshida K, Kawakami Y, Yang JH, Sayano T, Azuma N, Tanaka H, Kuhara S, Hirabayashi Y (2008) Inactivation of the 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene in mice: changes in gene expression and associated regulatory networks resulting from serine deficiency. *Functional & integrative genomics* 8:235-249.
- Garcia-Marin V, Garcia-Lopez P, Freire M (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci* 30:479-487.
- Genoud C, Quairiaux C, Steiner P, Hirling H, Welker E, Knott GW (2006) Plasticity of Astrocytic Coverage and Glutamate Transporter Expression in Adult Mouse Cortex. *PloS Biology* 4:2057-2064.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature reviews Neuroscience* 11:87-99.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP, Baker A, Carlson KC, Harding B, Perrino P (1988) Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Archives of Neurology* 45:836-840.
- Gliddon CM, Shao Z, LeMaistre JL, Anderson CM (2009) Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *Journal of neurochemistry* 108:372-383.
- Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Gotz J, Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature reviews Neuroscience* 9:532-544.

- Graeber MB, Mehraein P (1999) Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249:III/10-III/13.
- Groc L, Bard L, Choquet D (2009) Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158:4-18.
- Haas B, Schipke CG, Peters O, Sohl G, Willecke K, Kettenmann H (2006) Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cereb Cortex* 16:237-246.
- Haass C, de Strooper B (1999) The Presenilins in Alzheimer's Disease - Proteolysis Holds the Key. *Science* 286:916-919.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:101-112.
- Haddad-Mashadrizheh A, Zomorodipour A, Izadpanah M, Sam MR, Ataei F, Sabouni F, Hosseini SJ (2009) A systematic study of the function of the human beta-globin introns on the expression of the human coagulation factor IX in cultured Chinese hamster ovary cells. *The journal of gene medicine* 11:941-950.
- Halim ND, McFate T, Mohyeldin A, Okagaki P, Korotchikina LG, Patel MS, Jeoung NH, Harris RA, Schell MJ, Verma A (2010) Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* 58:1168-1176.
- Hamilton NB, Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature reviews Neuroscience* 11:227-238.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Harr SD, Simonian NA, Hyman BT (1995) Functional alterations in Alzheimer's disease: decreased glucose transporter 3 immunoreactivity in the perforant pathway terminal zone. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:38-41.
- Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Okada S-i, Komatsu N, Okamura N, Koike K, Koizumi H, Kumakiri C, Imai K, Iyo M (2004) Possible role of d-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 28:385-388.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
- Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, Bolanos JP (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature cell biology* 11:747-752.
- Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, LaFerla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y (2008) Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain research* 1216:92-103.
- Ho GJ, Hashimoto M, Adame A, Izu M, Alford MF, Thal LJ, Hansen LA, Masliah E (2005) Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role. *Neurobiol Aging* 26:625-635.
- Hou B-H, Takanaga H, Grossmann G, Chen L-Q, Qu X-Q, Jones AM, Lalonde S, Schweissgut O, Wiechert W, Frommer WB (2011) Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. *Nature Protocols* 6:1818-1833.
- Houades V, Rouach N, Ezan P, Kirchhoff F, Koulakoff A, Giaume C (2006) Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biol* 3-14.
- Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Current opinion in neurobiology* 14:346-352.
- Huang YH, Dykes-Hoberg M, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2004) Climbing fiber activation of EAAT4 transporters and kainate receptors in cerebellar Purkinje cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:103-111.
- Hung YP, Albeck JG, Tantama M, Yellen G (2011) Imaging cytosolic NADH-NAD(+) redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab* 14:545-554.
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience* 5:347-360.

- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of neuroimmunology* 24:173-182.
- Jeon GS, Choi DH, Lee HN, Kim DW, Chung CK, Cho SS (2009) Expression of L-serine biosynthetic enzyme 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) and neutral amino acid transporter ASCT1 following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Neurochemical research* 34:827-834.
- Karch CM, Goate AM (2015) Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry* 77:43-51.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63:287-303.
- Komori T, Shibata N, Kobayashi M, Sasaki S, Iwata M (1998) Inducible nitric oxide synthase (iNOS)-like immunoreactivity in argyrophilic, tau-positive astrocytes in progressive supranuclear palsy. *Acta neuropathologica* 95:338-344.
- Kowall NW, Kosik KS (1987) Axonal Disruption and Aberrant Localization of Tau Protein Characterize the Neuropil Pathology of Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology* 22:639-643.
- Laake K, Oeksengaard AR (2002) D-cycloserine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2.
- Laakso MP, Soininen H, Partanen K, Helkala EL, Hartikainen P, Vainio P, Hallikainen M, Hänninen T, Riekkinen PJS (1995) Volumes of hippocampus, amygdala and frontal lobes in the MRI-based diagnosis of early Alzheimer's disease: correlation with memory functions. *Journal of neural transmission Parkinson's disease and dementia section* 9:73-86.
- Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreiros N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA, Hillman EM, Tegeder I, Murphy TH, Hamel E, Cauli B (2015) COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:11791-11810.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thornton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau MT, Choi SH, Reitz C, Pasquier F, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letenneur L, Moron FJ, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fievet N, Huentelman MW, Gill M, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Green R, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleo A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossu P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez-Garcia F, Fox NC, Hardy J, Deniz Naranjo MC, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F, European Alzheimer's Disease I, Genetic, Environmental Risk in Alzheimer's D, Alzheimer's Disease Genetic C, Cohorts for H, Aging Research in Genomic E, Moebus S, Mecocci P, Del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Lannefelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alvarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Gu W, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH, Jr., Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RF, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JS, Boerwinkle E, Riemenschneider M, Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Schmidt R, Rujescu D, Wang LS, Dartigues JF, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nothen MM, Graff C, Psaty BM, Jones L, Haines JL, Holmans PA, Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Moskvina V, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD, Amouyel P (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45:1452-1458.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *PNAS* 95:6448-6453.

- Larsen BR, Assentoft M, Cotrina ML, Hua SZ, Nedergaard M, Kaila K, Voipio J, MacAulay N (2014) Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K(+) clearance and volume responses. *Glia* 62:608-622.
- Lebenberg J, Herard AS, Dubois A, Dhenain M, Hantraye P, Delzescaux T (2011) A combination of atlas-based and voxel-wise approaches to analyze metabolic changes in autoradiographic data from Alzheimer's mice. *Neuroimage* 57:1447-1457.
- Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M (2008) GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56:481-493.
- Lerchundi R, Fernandez-Moncada I, Contreras-Baeza Y, Sotelo-Hitschfeld T, Machler P, Wyss MT, Stobart J, Baeza-Lehnert F, Alegria K, Weber B, Barros LF (2015) NH₄⁺ triggers the release of astrocytic lactate via mitochondrial pyruvate shunting. *PNAS* 112:11090-11095.
- Lin CH, Chen PK, Chang YC, Chuo LJ, Chen YS, Tsai GE, Lane HY (2014) Benzoate, a D-amino acid oxidase inhibitor, for the treatment of early-phase Alzheimer disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biological psychiatry* 75:678-685.
- Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, Vokes NI, Sasaki M, Beroukhi R, Stephanopoulos G, Ligon AH, Meyerson M, Richardson AL, Chin L, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Cantley LC, Vander Heiden MG (2011) Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet* 43:869-874.
- Lorenzo MP, Villasenor A, Ramamoorthy A, Garcia A (2013) Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: application to bipolar disorder study. *Electrophoresis* 34:1701-1709.
- Lundgaard I, Li B, Xie L, Kang H, Sanggaard S, Haswell JD, Sun W, Goldman S, Blekot S, Nielsen M, Takano T, Deane R, Nedergaard M (2015) Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nature communications* 6:6807.
- Lunt SY, Vander Heiden MG (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology* 27:441-464.
- MacVicar BA, Newman EA (2015) Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7.
- Madeira C, Lourenco MV, Vargas-Lopes C, Suemoto CK, Brandao CO, Reis T, Leite RE, Laks J, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, Grinberg LT, Ferreira ST, Panizzutti R (2015) d-serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development. *Transl Psychiatry* 5:e561.
- Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *The Journal of experimental biology* 209:2304-2311.
- Magistretti PJ, Allaman I (2015) A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86:883-901.
- Malarkey EB, Parpura V (2011) Temporal characteristics of vesicular fusion in astrocytes: examination of synaptobrevin 2-laden vesicles at single vesicle resolution. *The Journal of physiology* 589:4271-4300.
- Mangia S, Simpson IA, Vannucci SJ, Carruthers A (2009) The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *Journal of neurochemistry* 109 Suppl 1:55-62.
- Marchetti C, Marie H (2011) Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Reviews in the neurosciences* 22:373-402.
- Martineau M (2013) Gliotransmission: focus on exocytotic release of L-glutamate and D-serine from astrocytes. *Biochemical Society transactions* 41:1557-1561.
- Martineau M, Parpura V, Mothet JP (2014) Cell-type specific mechanisms of D-serine uptake and release in the brain. *Frontiers in synaptic neuroscience* 6:12.
- Masciopinto F, Di Pietro N, Corona C, Bomba M, Pipino C, Curcio M, Di Castelnuovo A, Ciavardelli D, Silvestri E, Canzoniero LM, Sekler I, Pandolfi A, Sensi SL (2012) Effects of long-term treatment with pioglitazone on cognition and glucose metabolism of PS1-KI, 3xTg-AD, and wild-type mice. *Cell death & disease* 3:e448.
- Masliah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA (1989) Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neuroscience letters* 103:234-239.

- Mastrangelo MA, Bowers WJ (2008) Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC neuroscience* 9:81.
- Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P (2008) Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience* 156:898-910.
- Merlini M, Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Nitsch RM (2011) Vascular beta-amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcAbeta mice. *Acta neuropathologica* 122:293-311.
- Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA (2014) Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical epidemiology* 6:37-48.
- Miller HR, Raff MC (1984) Fibrous and Protoplasmic Astrocytes are Biochemically and Developmentally Distinct. *The journal of Neuroscience* 4:585-592.
- Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 510:641-654.
- Mosconi L (2005) Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 32:486-510.
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ (2010) Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 20:843-854.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:5606-5611.
- Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, Rossor M, Crook R, Hardy J, Duff K, Crawford F (1992) A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nature Genetics* 2:340-342.
- Mustafa AK, Kumar M, Selvakumar B, Ho GP, Ehmsen JT, Barrow RK, Amzel LM, Snyder SH (2007) Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:2950-2955.
- Nagata Y, Borghi M, Fisher GH, D'Aniello A (1995) Free D-Serine Concentration in Normal and Alzheimer Human Brain. *Brain Research Bulletin* 38:181-183.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:663-674.
- Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gomez-Gonzalo M, Nunez A, Martin ED, Araque A (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 10:e1001259.
- Nelson RL, Guo Z, Halagappa VM, Pearson M, Gray AJ, Matsuoka Y, Brown M, Clark RF, Mattson MP (2007) Prophylactic Treatment with Paroxetine Ameliorates Behavioral Deficits and Retards the Development of Amyloid and Tau Pathologies in 3xTgAD Mice. *Exp Neurol* 201:166-176.
- Nicholson RM, Kusne Y, Nowak LA, LaFerla FM, Reiman EM, Valla J (2010) Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain research* 1347:179-185.
- Nishimura M, Namba Y, Ikeda K, Oda M (1992) Glial fibrillary tangles with straight tubules in the brains of patients with progressive supranuclear palsy. *Neuroscience letters* 143:35-38.
- Niwa K, Carlson GA, Iadecola C (2000) Exogenous Aβ₃₁₋₄₀ Reproduces Cerebrovascular Alterations Resulting From Amyloid Precursor Protein Overexpression in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 20:1659-1668.
- Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C (2002) Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiology of disease* 9:61-68.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in molecular biology* 814:23-45.

- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:3276-3287.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b) Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39:409-421.
- Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodriguez JJ (2010) Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 58:831-838.
- Oliveira LT, Leon GV, Provance DW, Jr., de Mello FG, Sorenson MM, Salerno VP (2015) Exogenous beta-amyloid peptide interferes with GLUT4 localization in neurons. *Brain research* 1615:42-50.
- Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AH, Kooijman L, Bossers K, Hol EM (2014a) Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging* 35:2746-2760.
- Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Melief J, Kooijman L, Huitinga I, Klooster J, Bossers K, Hol EM (2014b) Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiol Aging* 35:1-14.
- Overk CR, Perez SE, Ma C, Taves MD, Soma KK, Mufson EJ (2013) Sex steroid levels and AD-like pathology in 3xTgAD mice. *Journal of neuroendocrinology* 25:131-144.
- Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785-798.
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-116.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci* 91:10625-10629.
- Perdahl E, Adolfsson R, Alafuzoff I, Albert KA, Nestler EJ, Greengard P, Winkblad B (1984) Synapsin I (protein I) in different brain regions in senile dementia of Alzheimer type and in multi-infarct dementia. *Journal of neural transmission* 60:133-141.
- Phivilay A, Julien C, Tremblay C, Berthiaume L, Julien P, Giguere Y, Calon F (2009) High dietary consumption of trans fatty acids decreases brain docosahexaenoic acid but does not alter amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 159:296-307.
- Pomilio C, Pavia P, Gorojod RM, Vinuesa A, Alaimo A, Galvan V, Kotler ML, Beauquis J, Saravia F (2015) Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in A β internalization. *Hippocampus*.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic Neurotransmitter Receptors in situ and in vivo. *Progress in Neurobiology* 51:439-455.
- Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM (2011) Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476:346-350.
- Rae EA, Brown RE (2015) The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews*.
- Reeves AM, Shigetomi E, Khakh BS (2011) Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: key limitations and improvements using morphological maps. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:9353-9358.

- Regan MR, Huang YH, Kim YS, Dykes-Hoberg MI, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD (2007) Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:6607-6619.
- Rodriguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A (2015) Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*.
- Rodriguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A (2009) Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation* 16:378-385.
- Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida OF (2005) Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:11061-11070.
- Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, Wolosker H (2010) Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24:2951-2961.
- Rossner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR (2005) Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *Journal of neurochemistry* 92:226-234.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science* 322:1551-1555.
- Rountree SD, Chan W, Pavlik VN, Darby EJ, Doody RS (2012) Factors that influence survival in a probable Alzheimer disease cohort. *Alzheimer's research & therapy* 4:16.
- Rutter AR, Fradley RL, Garrett EM, Chapman KL, Lawrence JM, Rosahl TW, Patel S (2007) Evidence from gene knockout studies implicates Asc-1 as the primary transporter mediating d-serine reuptake in the mouse CNS. *The European journal of neuroscience* 25:1757-1766.
- Sacchi S (2013) D-Serine metabolism: new insights into the modulation of D-amino acid oxidase activity. *Biochemical Society transactions* 41:1551-1556.
- Sakai K, Shimizu H, Koike T, Furuya S, Watanabe M (2003) Neutral Amino Acid Transporter ASCT1 Is Preferentially Expressed in L-Ser-Synthetic/Storing Glial Cells in the Mouse Brain with Transient Expression in Developing Capillaries. *The journal of Neuroscience* 23:550-560.
- San Martin A, Ceballo S, Baeza-Lehnert F, Lerchundi R, Valdebenito R, Contreras-Baeza Y, Alegria K, Barros LF (2014) Imaging Mitochondrial Flux in Single Cells with a FRET Sensor for Pyruvate. *PLoS One* 9:1-9.
- San Martin A, Ceballo S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF (2013) A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and Its Use To Detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells. *PLoS One*.
- Sancheti H, Kanamori K, Patil I, Diaz Brinton R, Ross BD, Cadenas E (2014a) Reversal of metabolic deficits by lipoic acid in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a ¹³C NMR study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34:288-296.
- Sancheti H, Patil I, Kanamori K, Diaz Brinton R, Zhang W, Lin AL, Cadenas E (2014b) Hypermetabolic state in the 7-month-old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease and the effect of lipoic acid: a ¹³C-NMR study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34:1749-1760.
- Santa-Maria I, Haggiagi A, Liu X, Wasserscheid J, Nelson PT, Dewar K, Clark LN, Crary JF (2012) The MAPT H1 haplotype is associated with tangle-predominant dementia. *Acta neuropathologica* 124:693-704.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* 298:789-791.
- Selkoe DJ (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural brain research* 192:106-113.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1:a006189.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:2866-2875.

- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.
- Shao Z, Kamboj A, Anderson CM (2009) Functional and immunocytochemical characterization of D-serine transporters in cortical neuron and astrocyte cultures. *Journal of neuroscience research* 87:2520-2530.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.
- Shigetomi E, Bushong EA, Hausteiner MD, Tong X, Jackson-Weaver O, Kracun S, Xu J, Sofroniew MV, Ellisman MH, Khakh BS (2013) Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *The Journal of general physiology* 141:633-647.
- Shih AY, Erb H, Sun X, Toda S, Kalivas PW, Murphy TH (2006) Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:10514-10523.
- Sholl DA (1953) Dendritic Organization in the Neurons of the Visual and Motor Cortices of the Cat. *Journal of Anatomy* 87:387-406.
- Simpson IA, Chundu KR, Davies-Hill T, Honer WG, Davies P (1994) Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 35:546-551.
- Sofroniew MV (2015) Astroglialosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020420.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of neurochemistry* 28:897-916.
- Sorbi S, Bird ED, Blass JP (1983) Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Annals of Neurology* 13:72-78.
- Sotelo-Hitschfeld T, Fernandez-Moncada I, Barros LF (2012) Acute feedback control of astrocytic glycolysis by lactate. *Glia* 60:674-680.
- Spires-Jones TL, Hyman BT (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82:756-771.
- Sun JY, Anand-Jawa V, Chatterjee S, Wong KK (2003) Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther* 10:964-976.
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810-823.
- Suzuki M, Sasabe J, Miyoshi Y, Kuwasako K, Muto Y, Hamase K, Matsuoka M, Imanishi N, Aiso S (2015) Glycolytic flux controls D-serine synthesis through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:E2217-2224.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichibara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Tong X, Shigetomi E, Looger LL, Khakh BS (2013) Genetically encoded calcium indicators and astrocyte calcium microdomains. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 19:274-291.
- Tsai HH, Li H, Fuentealba LC, Molofsky AV, Taveira-Marques R, Zhuang H, Tenney A, Murnen AT, Fancy SP, Merkle F, Kessaris N, Alvarez-Buylla A, Richardson WD, Rowitch DH (2012) Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* 337:358-362.

- Tu S, Okamoto SI, Lipton SA, Xu H (2014) Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* 9:1-12.
- Valla J, Gonzalez-Lima F, Reiman EM (2008) FDG autoradiography reveals developmental and pathological effects of mutant amyloid in PDAPP transgenic mice. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26:253-258.
- Valla J, Schneider L, Reiman EM (2006) Age- and transgene-related changes in regional cerebral metabolism in PSAPP mice. *Brain research* 1116:194-200.
- Verleysdonk S, Hamprecht B (2000) Synthesis and release of L-serine by rat astroglia-rich primary cultures. *Glia* 30:19-26.
- Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Valles J, Garcia-Fojeda B, Criado-Garcia O, Fernandez-Sanchez E, Medrano-Fernandez I, Dominguez J, Garcia-Rocha M, Soriano E, Rodriguez de Cordoba S, Guinovart JJ (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nature neuroscience* 10:1407-1413.
- Vlassenko AG, Vaishnavi SN, Couture L, Sacco D, Shannon BJ, Mach RH, Morris JC, Raichle ME, Mintun MA (2010) Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid-beta (A β) deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:17763-17767.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-286.
- Wang Z, Yang D, Zhang X, Li T, Tang Y, Le W (2011) Hypoxia-induced down-regulation of neprilysin by histone modification in mouse primary cortical and hippocampal neurons. *PLoS One* 6.
- Watake K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *The European journal of neuroscience* 10:976-988.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 5:1237-1239.
- Whitwell JL (2010) Progression of atrophy in Alzheimer's disease and related disorders. *Neurotoxicity research* 18:339-346.
- Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, Hornburg D, Evans LD, Moore S, Daria A, Hampel H, Muller V, Giudici C, Nuscher B, Wenninger-Weinzierl A, Kremmer E, Heneka MT, Thal DR, Giedraitis V, Lannfelt L, Muller U, Livesey FJ, Meissner F, Herms J, Konnerth A, Marie H, Haass C (2015) ϵ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*.
- Winkler EA, Nishida Y, Sagare AP, Rege SV, Bell RD, Perlmutter D, Sengillo JD, Hillman S, Kong P, Nelson AR, Sullivan JS, Zhao Z, Meiselman HJ, Wenby RB, Soto J, Abel ED, Makshanoff J, Zuniga E, De Vivo DC, Zlokovic BV (2015) GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature neuroscience* 18:521-530.
- Wirths O, Bethge T, Marcello A, Harmeier A, Jawhar S, Lucassen PJ, Multhaup G, Brody DL, Esparza T, Ingelsson M, Kalimo H, Lannfelt L, Bayer TA (2010) Pyroglutamate A β pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *Journal of neural transmission* 117:85-96.
- Wolosker H (2011) Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1814:1558-1566.
- Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH (1999) Serine racemase: A glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13409-13414.
- Wolosker H, Radziszewsky I (2013) The serine shuttle between glia and neurons: implications for neurotransmission and neurodegeneration. *Biochemical Society transactions* 41:1546-1550.
- Wu SZ, Basile AS, Barger SW (2007) Induction of Serine Racemase Expression and D-Serine Release from Microglia by Secreted Amyloid Precursor Protein (sAPP). *Current Alzheimer Research* 4:243-251.
- Wu SZ, Bodles AM, Porter MM, Griffin WS, Basile AS, Barger SW (2004) Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *Journal of neuroinflammation* 1:1-11.

- Wu Y-T, Fratiglioni L, Matthews FE, Lobo A, Breteler MMB, Skoog I, Brayne C (2015) Dementia in western Europe: epidemiological evidence and implications for policy making. *The Lancet Neurology*.
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453-457.
- Yamamoto T, Nishizaki I, Nukada T, Kamegaya E, Furuya S, Hirabayashi Y, Ikeda K, Hata H, Kobayashi H, Sora I, Yamamoto H (2004) Functional identification of ASCT1 neutral amino acid transporter as the predominant system for the uptake of L-serine in rat neurons in primary culture. *Neuroscience research* 49:101-111.
- Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M (2001) 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase, a Key Enzyme for L-Serine Biosynthesis, Is Preferentially Expressed in the Radial Glia/Astrocyte Lineage and Olfactory Ensheathing Glia in the Mouse Brain. *The journal of Neuroscience* 21:7691-7704.
- Yang J, Ruchti E, Petit JM, Jourdain P, Grenningloh G, Allaman I, Magistretti PJ (2014) Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *PNAS* 111:12228-12233.
- Yang JH, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita MO, Tomonaga S, Azuma N, Watanabe M, Hamase K, Zaitzu K, Machida T, Messing A, Itohara S, Hirabayashi Y, Furuya S (2010) Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *The Journal of biological chemistry* 285:41380-41390.
- Yeh CY, Vadhvana B, Verkhatsky A, Rodríguez JJ (2011) Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Asn Neuro* 3:271-279.
- Yoshida K, Furuya S, Osuka S, Mitoma J, Shinoda Y, Watanabe M, Azuma N, Tanaka H, Hashikawa T, Itohara S, Hirabayashi Y (2004) Targeted disruption of the mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene causes severe neurodevelopmental defects and results in embryonic lethality. *The Journal of biological chemistry* 279:3573-3577.
- Zhang X, Zhou K, Wang R, Cui J, Lipton SA, Liao FF, Xu H, Zhang YW (2007) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation. *The Journal of biological chemistry* 282:10873-10880.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:11929-11947.
- Zlokovic BV (2011) Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews Neuroscience* 12:723-738.
- Zumkehr J, Rodriguez-Ortiz CJ, Cheng D, Kieu Z, Wai T, Hawkins C, Kilian J, Lim SL, Medeiros R, Kitazawa M (2015) Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 36:2260-2271.