Le métabolisme astrocytaire de la L-sérine et ses implications dans la maladie d'Alzheimer : une potentielle approche thérapeutique

Pierre-Antoine Vigneron

▶ **To cite this version:**

Pierre-Antoine Vigneron. Le métabolisme astrocytaire de la L-sérine et ses implications dans la maladie d'Alzheimer : une potentielle approche thérapeutique. Neurobiologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL016 . tel-02976106

HAL Id: tel-02976106
https://theses.hal.science/tel-02976106

Submitted on 23 Oct 2020

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

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

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASL016

université PARIS-SACLAY

Le métabolisme astrocytaire de la L-sérine et ses implications dans la maladie d'Alzheimer : une potentielle approche thérapeutique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°568 : Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

CEA Paris-Saclay, CNRS
Molecular Imaging Research Center (MIRCen)
Laboratoire des maladies neurodégénératives
92 260 Fontenay-aux-Roses

Faculté de Médecine

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 1er octobre 2020, par

Pierre-Antoine VIGNERON

Composition du Jury

Pr. Alain GARDIER Professeur des Universités, Université Paris-Saclay	Président du jury
Pr. Christophe MAGNAN Professeur des Universités, Université de Paris	Rapporteur & Examinateur
Dr. Marie-Claude POTIER Directrice de Recherche, Institut du Cerveau	Rapportrice & Examinatrice
Dr. Fanny MOCHEL Maîtresse de Conférences des Universités – Praticienne Hospitalière, HDR, Institut du Cerveau	Examinatrice
Dr. Gilles BONVENTO Directeur de Recherche, CEA Paris-Saclay	Directeur de thèse
Dr. Jean LIVET Directeur de Recherche, Institut de la Vision	Invité

A ma grand-mère, Suzanne Vigneron.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, et tout particulièrement Marie-Claude Potier et Christophe Magnan pour leur rôle de rapporteur. Je remercie également Alain Gardier, Jean Livet et Fanny Mochel pour leur présence le jour de la soutenance. Votre temps, votre considération et vos retours me sont d'une aide inestimable.

Un très grand merci également à la Fondation pour la Recherche Médicale d'avoir cru en ce projet et accepté de financer ma thèse.

Merci à Philippe Hantraye et Romina Aron Badin pour m'avoir permis de rejoindre la grande famille de MIRCen et à Emmanuel Brouillet et Gilles Bonvento pour leur accueil au sein du LMN. Merci également à toute l'équipe qui permet de faire tourner ce labo et pour m'avoir sauvé la mise à maintes reprises. Cécile, Béatrice, Marie-Laure, pour tous ces billets de trains réservés pour rien, Laurent, j'espère que tu ne me tiendras pas rigueur de t'avoir appelé à 21h un vendredi soir, Kristell, Chrysis.

Gilles, le grand Manitou. Merci d'avoir cru en moi pendant ces (presque) 4 années et de m'avoir épaulé. Merci pour ton temps, qui commence à manquer mais qu'importe, tu m'as toujours fait passer en priorité. Merci pour toutes nos discussions, scientifiques ou un peu moins et pour tous tes précieux conseils. Merci d'être proche de tes étudiants, de m'avoir toujours inclus dans tes réflexions scientifiques et d'avoir passé des heures en manips avec moi. Je suis conscient d'avoir eu une chance incroyable de t'avoir pour me superviser pendant toutes ces années. Merci également pour la liberté que tu m'as laissée pour conduire et imaginer des expériences. Tu es toujours le premier à vouloir développer de nouvelles techniques au laboratoire, ce qui a été un grand atout pour ma formation.

Notre équipe de mini-Bonvento, Marianne et Mylène, sans qui cette thèse n'aurait certainement pas eu lieu. Marianne, tout ce chemin parcouru depuis que nous nous connaissons ! J'ai souvenir de nous, en voyage à Berlin, petit conscrit que j'étais, éberlué de discuter avec une agrégée ! Quand tu m'as demandé de diffuser auprès de l'ENS une offre de stage de M2 dans ton équipe, j'étais loin d'imaginer que la place serait pour moi ! Tu m'as formé au fonctionnement de notre labo et à de multiples techniques, aiguillé, réconforté, motivé, toujours dans la patience, la compréhension et l'efficacité. Le chercheur que je suis devenu aujourd'hui (et qui comprend les stats !) t'est largement redevable : merci !

Mylène, il me faudrait des pages pour te remercier à la hauteur de l'aide que tu m'as apportée pendant cette thèse. J'ai toujours pu compter sur toi, qu'importe la manip farfelue dans laquelle je t'embrigadais, qu'importe le temps que ça pouvait prendre ou la pénibilité de l'expérience. Merci de m'avoir épaulé et d'avoir toujours pris mes bourdes avec le sourire (on se souviendra de la panique d'un génotypage raté que tu n'as pas hésité à refaire pour réparer ma boulette de dilution !). Tu m'as toujours soutenu dans tout ce que je voulais entreprendre, aussi bien au labo que dans ma vie d'après-thèse. Ta patience et ton envie de transmettre

m'ont permis d'apprendre et de m'essayer à de nombreuses chirurgies, même si, au final, heureusement que tu étais là pour les finir quand je paniquais ! J'ai tellement apprécié de travailler avec toi et notre binôme m'a tant apporté, à la fois sur les plans professionnel et personnel. L'intégrité et la rigueur scientifique dont tu fais preuve et que tu m'as transmises m'accompagneront, je le souhaite, toute ma future carrière !

Une petite pensée pour Claire également, que j'ai eu la joie de former durant son stage de M2. Ta bonne humeur constante et ta bonne volonté ont permis d'égayer ce qu'on nommera « le sujet CRISPR/Cas9 ».

Si ces quatre années sont passées si vite et bien, c'est aussi et surtout grâce à la grande famille MIRCen. Que ce soit à travers une aide ponctuelle, des conseils avisés, ou simplement autour d'un café, notre labo regorge de personnes merveilleuses, prêtes à tout donner pour leurs étudiant-e-s. La bonne humeur primant toujours. Marie-Claude, Noëlle, Gwen, Alexis, merci pour votre aide en biologie moléculaire et les heures passées à discuter des résultats d'électrophorèse. Karine, Julien, merci pour votre formation aux expériences de comportement. Caro, Pauline, Fanny, merci de m'avoir formé à l'histologie et d'avoir toujours répondu présentes pour les petits tracas de l'histo. Emmanuel, Carole, Karine, Marie-Claude, Caro, Thierry, Nicolas, Géraldine, Céline, Lev, Emilie, merci pour votre disponibilité et nos discussions scientifiques, vos conseils m'ont permis d'appréhender de nouveaux aspects de ma thèse. Julie, merci pour ton soutien et ton aide pendant la dernière ligne droite de la rédaction.

Un paragraphe spécial pour ma Josie, Josette, Charlène, sans qui ces années à MIRCen auraient été un peu moins douces ! Tu as été un vrai rayon de soleil pour moi durant ces années de thèse, m'offrant ton soutien à chaque petit coup de mou. J'espère avoir pu t'apporter au moins un dixième de la joie que tu m'as apportée. Merci pour tout ! Ah, et accessoirement, merci pour tes heures passées à préparer mes virus !

Que serait un laboratoire de recherche sans ses étudiants et étudiantes, prêt-e-s à se sacrifier pour la science ? Quelle fine équipe nous avons formé toutes ces années ! Partageant boulettes, déboires et … bières ! Merci à Océane, Fanny, Charlotte, Emma, Miriam, Mélissa, JB, Yohann, Suzanne, Marina, Lucile, Ludmila, Marianne, Clémence, Clément et Laurene. L'équipage change au fil des ans, mais le voyage reste le même, parsemé d'embûches, de défaites et de victoires mais surtout de vos sourires et votre réconfort. Merci à tous et à toutes pour votre soutien, pour les rires et pour tous ces merveilleux moments. L'entente entre les étudiant-e-s dans ce labo est, je pense, son plus grand atout. Vous allez me manquer, mais n'allez pas croire que vous serez si facilement débarrassé-e-s de moi ! A celles et ceux qui restent après mon passage, puissiez-vous continuer à faire vivre l'entraide et la chaleur mircenniennes. Et surtout, force et honneur pour la suite !

Évidemment, je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée émue à l'idée de quitter le bureau 210C des moulas. Océane (Guillemaud l'asticot les bons tuyaux), Charlotte (Efficace et pas chère) et Fanny (Nyfa Leboule-la-Queen), mes comparses de thèse. Vous avoir à mes côtés pendant ces années de durs labeurs m'a permis de continuer à avancer jusqu'à l'écriture de ce manuscrit, et sans vous, c'était pas gagné ! Je pense qu'on peut dire qu'on en aura fait voir de toutes les couleurs à MIRCen. Je garderai de si bons souvenirs de toutes nos conneries, de nos fous rires. Plus que des collègues, vous avez été de vraies béquilles sur lesquelles m'appuyer, de vraies amies sur lesquelles j'ai pu compter. Merci, du plus profond de mon cœur. Océ, nous finissons comme nous avons commencé, ensemble. Cha et Nyfa, je vous souhaite tout le

courage nécessaire pour les derniers mois qui vous restent. Puissent nos chemins se recroiser aussi souvent que possible.

J'ai eu la formidable chance de passer 3 mois de ma thèse à Salamanca, en Espagne. Je tiens à remercier Juan Pedro Bolaños et Angeles Almeida pour leur fabuleux accueil dans leur labo. A tous les membres de l'équipe, et plus particulièrement Marina, Carlos, Paula, Brenda et Irène, ce fut un réel plaisir d'apprendre à vous connaître et de découvrir à vos côtés la culture espagnole (et primaire). Merci de m'avoir formé à de nouvelles techniques et d'avoir ouvert mon esprit scientifique à de nouveaux aspects du métabolisme cellulaire (Team Game of ROS). Je vous remercie également pour toutes nos discussions non scientifiques, à propos de la vie, du futur, d'un monde meilleur. Mon temps parmi vous n'a été que joie, réflexions et rires.

Parce que le travail d'une thèse ne me suffisait pas, j'ai également eu le plaisir de réaliser une mission doctorale de vulgarisation des sciences durant mes deux premières années de doctorat. Je tenais à utiliser quelques lignes pour remercier chaleureusement mes anciens collègues du COMPAS et de la MISS, Nicolas, Séverine, Sylvie, Anaïs, Romuald, Valérie, Elisabeth. Travailler à vos côtés m'a permis de m'aérer l'esprit de ma thèse, et pour ça, un immense merci. Merci également pour tout ce que vous m'avez appris et pour avoir ajouté la corde de la communication scientifique à mon arc.

Quelques lignes pour mes parents, évidemment. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir été d'un soutien indéfectible pendant ces 26 années. Merci d'avoir respecté tous mes choix et de ne m'avoir jamais imposé les vôtres. J'ai conscience d'avoir été privilégié grâce à vous, ce qui m'a permis de toujours me concentrer sur mes études pour donner le meilleur de moi-même. Merci d'être une oreille attentive, de m'aiguiller du mieux que vous pouvez et de ne jamais vous lasser de mes histoires d'astrocytes ! Je vous dois tant.

A mon grand-père, qui ne comprend absolument pas ce que je fais, mais qui est si heureux de pouvoir s'en vanter. Puisse la lueur de tes yeux fiers et aimants, toujours éclairer mon chemin.

Finalement, et pas des moindres, un immense merci à mes ami-e-s qui me soutiennent inconditionnellement (décidemment, il en faut du soutien pour venir à bout d'une thèse !). Yasmine et Clara (Tatouille), ma famille gentilléenne avec qui je partage mes journées, mes hauts et mes bas. Merci à Tatouille d'avoir occupé ses trajets en train avec la relecture de mon introduction et à Sminou pour ses précieux conseils sur les schémas. Sara (Zouzou), Benji, Robin, Quentin et Laure, avec qui tout a commencé sous le sigle Bio14. Sans oublier Jill(ou), qui m'a accueilli à bras ouverts à l'ENS. Rendez-vous compte de tout ce chemin parcouru depuis la conscritude, époque à laquelle je vous clamais haut et fort ô combien il était inenvisageable que je fasse une thèse… ! Un mot supplémentaire pour ma Zouzou, loin des yeux, mais jamais (JAMAIS !) du cœur. Ton regard est empli d'une amitié qui m'est si précieuse. Qui aurait pu prévoir qu'un brossage de dents et un TP de génétique s'avèreraient si essentiels à mon bonheur ? Lucas, mon acolyte depuis le collège. Tu sais quoi ? On a encore tellement de choses à se raconter … ! Adam, qui, depuis notre bromance américano-danoise, continue de suivre les aventures de son petit *rude-stinky-smoking Frenchie* depuis Washington. A tous et toutes, votre amitié me façonne tous les jours un peu plus en quelqu'un de meilleur. Puisse cela durer encore longtemps, très longtemps.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIÈRES 1

TABLE DES ABRÉVIATIONS 5

INTRODUCTION 9

1. LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE DANS LE CERVEAU 11

1.1. LE GLUCOSE COMME SOURCE D'ÉNERGIE 11
1.2. LES DEMANDES ÉNERGÉTIQUES DU CERVEAU 13
1.2.1. Activité électrique et maintien des gradients ioniques par les pompes ATPases 14
1.2.2. Production et libération de neurotransmetteurs 16
1.2.3. Utilisation d'ATP par les cellules gliales 16
1.3. LES ASTROCYTES ET LES NEURONES PRÉSENTENT DES PROFILS MÉTABOLIQUES DIFFÉRENTS 17
1.3.1. Profil métabolique des neurones 18
1.3.2. Profil métabolique des astrocytes 19
1.4. LE GLUCOSE COMME PRÉCURSEUR DE NOMBREUSES MACROMOLÉCULES 20
1.4.1. Le glucose participe à la lutte anti- … glucose (homéostasie redox) 21
1.4.2. Le glucose participe à la prolifération cellulaire 22
1.4.3. Le glucose participe à la synthèse de neurotransmetteurs 23

2. LES INTERACTIONS NEURONES-ASTROCYTES 25

2.1. INTERACTIONS PHYSIQUES : NEURONES ET ASTROCYTES FORMENT DES SYNAPSES TRIPARTITES 25
2.1.1. La gliotransmission 25
2.1.2. Le recyclage du glutamate 26
2.1.3. L'homéostasie potassique 28
2.2. INTERACTIONS & SIGNALISATIONS MÉTABOLIQUES : L'ÉCHANGE DE MÉTABOLITES ISSUS DU GLUCOSE 28

3. LA MALADIE D'ALZHEIMER 32

3.1. CARACTÉRISATION GÉNÉRALE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 32
3.1.1. Caractérisation anatomopathologique 33
3.1.2. Les prédispositions génétiques associées à la maladie d'Alzheimer 37
3.1.3. Traitements et essais cliniques 38
3.2. L'HYPO-MÉTABOLISME DU GLUCOSE, UN SIGNE PRÉCOCE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 39
3.3. LE MODÈLE MURIN 3XTG-AD POUR L'ÉTUDE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 42
3.3.1. Présentation générale du modèle 42
3.3.2. Les souris 3xTg-AD présentent des déficits synaptiques et cognitifs 45
3.3.3. Le cerveau des souris 3xTg-AD présente des altérations métaboliques 45
3.3.4. Amélioration des déficits synaptiques et cognitifs par la D-sérine 47

4. LE MÉTABOLISME DE LA L-SÉRINE DANS LE CERVEAU 49

4.1. LA BIOSYNTHÈSE DE LA L-SÉRINE DANS LE CERVEAU : LE *PHOSPHORYLATED PATHWAY* 49

4.1.1. Le glucose comme précurseur du PP 49
4.1.2. La biosynthèse de la L-sérine, une affaire d'astrocytes 51
4.2. Les rôles de la L-sérine dans le cerveau 53
4.2.1. L-sérine & Glycolyse 54
4.2.2. L-serine & Neurotransmission et métabolisme du carbone 54
4.2.3. L-sérine & Lipides 56
4.2.4. L-sérine & Espèces réactives de l'oxygène 58
4.2.5. L-sérine & Epigénétique 58
4.3. Pathologies & Potentiel thérapeutique de la L-sérine 59
5. Problématique 62
Materiels & Methodes 63
1. Animaux 65
1.1. Ethique et expérimentation animale 65
1.2. Hébergement et régime alimentaire 65
1.3. Les souris 3xTg-AD, modèles de la maladie d'Alzheimer 65
2. Infections virales 66
2.1. Design des plasmides 66
2.2. Production des vecteurs viraux AAV 67
2.3. Injections retro-orbitaires 68
3. Immunomarquage fluorescents sur tissus murins 69
3.1. Perfusion et fixation 69
3.2. Immunomarquages fluorescents 69
3.3. Quantification de la fluorescence cellule par cellule et analyse de la distribution 70
4. Immunomarquages sur tissus murins, macaque et humains 71
4.1. Origine des tissus 71
4.2. Immunomarquages au Ventana 72
4.3. Marquage de Nissl au violet de Crésyl 73
5. Analyses morphométriques des astrocytes et neurones 74
5.1. Perfusion, fixation et montage des coupes 74
5.2. Acquisition haute-résolution 74
5.3. Reconstruction 3D des astrocytes 74
5.4. Analyse de la reconstruction 3D 75
5.5. Analyse des neurones 76
6. Microscopie électronique 77
6.1. Perfusion et fixation 77
6.2. Préparation des coupes et acquisition des images 77
6.3. Quantification de la densité synaptique 78
6.4. Quantification et reconstruction 3D de la couverture astrocytaire 79
7. Cultures et co-cultures primaires de cellules murines 80
7.1. Culture primaire d'astrocytes 80
7.2. Culture primaire de neurones 81
7.3. Co-culture primaire de neurones et d'astrocytes 82
8. Biologie moléculaire 83

8.1. Extraction des ARN – Souris 83
8.2. Extraction des ARN – Culture primaire 83
8.3. Synthèse des ADN complémentaires 83
8.4. PCR quantitative en temps réel 84

9. Biochimie 85

9.1. Extraction des protéines – Souris 85
9.2. Extraction des protéines – Culture primaire 85
9.3. Extraction des protéines – Humains 85
9.4. Western-Blots 85
9.4.1. Western-Blot sur des dilutions sérielles de protéines 86
9.4.2. Western-Blot *stain-free* 87

10. Mesure des acides aminés *in vivo* 88

10.1. Chirurgie d'implantation du guide de microdialyse 88
10.2. Microdialyse 89
10.3. Chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) 90

11. Expérience de comportement : évaluation de la mémoire spatiale à long-terme par le test de la piscine de Morris 91

11.1. Habituation des animaux à l'expérimentateur 91
11.2. Apprentissage de la tâche 91
11.3. Test de mémoire à long-terme et analyse des données 92

12. Analyses statistiques 93

Resultats 95

1. Localisation cellulaire de la voie de biosynthèse de la L-sérine 97

1.1. Le PP est exprimé par les astrocytes *in vitro* 97
1.2. L'expression des enzymes du PP est principalement gliale 98

2. Le PP dans le contexte de la maladie d'Alzheimer 102

2.1. Le PP est altéré chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer 102
2.2. L'expression totale de la PHGDH n'est pas altérée dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD 103
2.3. Les astrocytes des souris 3xTg-AD expriment plus faiblement la PHGDH dans l'hippocampe 104
2.4. Les concentrations en L- et D-sérine sont diminuées dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD 109

3. L'implication du métabolisme de la L-sérine dans les déficits cognitifs des souris 3xTg-AD 111

3.1. Les souris 3xTG-AD présentent des dysmorphies astrocytaires mais pas neuronales 111
3.2. La couverture astrocytaire est inchangée chez les souris 3xTg-AD 115
3.3. Le régime enrichi en L-sérine restaure la mémoire spatiale des souris 3xTg-AD 116
3.4. Le régime enrichi en L-sérine restaure la taille des astrocytes des souris 3xTg-AD 118

Discussion 119

1. La biosynthèse de L-sérine dans le cerveau 121

1.1. La L-sérine est produite par les cellules gliales 121
1.2. La production de L-sérine est impactée par la maladie d'Alzheimer 122

2. LE MODÈLE MURIN 3XTG-AD POUR L'ÉTUDE DU PP DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER 124

2.1. LA PRODUCTION DE L-SÉRINE EST DIMINUÉE DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS 3XTG-AD 124
2.2. L'IMPLICATION DE LA L-SÉRINE DANS LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE 126
2.2.1. Les astrocytes 126
2.2.2. Les synapses et leur couverture astrocytaire 127

3. LE POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DE LA L-SÉRINE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER 130

3.1. LA SUPPLÉMENTATION EN L-SÉRINE EST BÉNÉFIQUE POUR LES SOURIS 3XTG-AD 130
3.2. INTERACTIONS ENTRE Aβ, TAU ET LA BIOSYNTHÈSE DE SÉRINE 130
3.3. LA PRISE DE L-SÉRINE POUR LES PATIENTS & LA NÉCESSITÉ DE DÉVELOPPER DE NOUVELLES MÉTHODES DE MESURE DE LA L- ET D-SÉRINE 131

4. LIMITES DE L'ÉTUDE 132

5. CONCLUSION 133

6. PERSPECTIVES 133

ANNEXES & COMMUNICATIONS 137

ANNEXE 1. FONCTIONNEMENT DES SONDES FRET 139
ANNEXE 2. COMPOSITION DES CROQUETTES ALTROMIN 1324 MODIFIÉES POUR CONTENIR 10% DE L-SÉRINE 141
ANNEXE 3. DÉTAIL DES P-VALUES CONCERNANT LES COMPARAISONS MULTIPLES ET ANALYSES DE DISTRIBUTION 143
COMMUNICATION 1. CHRONIC L-SERINE SUPPLEMENTATION IMPROVES COGNITIVE BEHAVIOR AND LONG-TERM POTENTIATION IN 3XTG-AD MICE, AN ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL 145
COMMUNICATION 2. IMPAIRMENT OF GLYCOLYSIS-DERIVED L-SERINE PRODUCTION IN ASTROCYTES CONTRIBUTES TO COGNITIVE DEFICITS IN ALZHEIMER'S DISEASE 147
COMMUNICATION 3. L-SERINE LINKS METABOLISM WITH NEUROTRANSMISSION 181

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 193

TABLE DES ABREVIATIONS

[U-^{13}C]	Uniformly labelled with Carbon 13
α-KG	α-KetoGlutarate
2-DG	[^{14}C]-2-Désoxy-Glucose
3PG	3-PhosphoGlycérate
3PHP	3-PhosphoHydroxyPyruvate
3PS	3-PhosphoSérine
3xTg-AD	Triple Transgenic Alzheimer's Disease mouse model
AAV	Adeno-Associated Virus
Aβ	Amyloïde Bêta
AcétylCoA	Acétyl-COenzyme A
Ach	AcéthylCHoline
aCSF	Artificial CerebroSpinal Fluid
AD	Alzheimer's Disease
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMBAR	Alzheimer's Management By Albumin Replacement
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid
ANLS	Astrocyte-Neuronal Lactate Shuttle
ApoE	APOlipoprotéine E
APP	Amyloid Precursor Protein
PSEN1/2	Présiniline 1/2
Asc-1	Système de transport sodium-indépendant Alanine-Sérine-Cystéine-1
ASCT-1	Système de transport sodium-dépendant Alanine-Sérine-Cystéine-Thréonine-1
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATP	Adénosine TriPhosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BSA	Bovine Serum Albumin

CBA	Chicken-β-Actin
CBS	Cystathione β-Synthase
cDNA	Complementary DNA
CDR-SOB	Clinical Dementia Rating-Sum Of Boxes
DAAO	D-Amino Acid Oxidase
DAB	3,3'-DiAminoBenzidine
DAM	Disease-Associated Microglia
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DTT	DiThioThreitol
EAAT1/2	Excitatory Amino Acid Transporter ½
EIF2α	Eukaryotic Initiation Factor 2 subunit α
exRNA	EXtracellular RNA
$FADH_2$	Flavine Adenine Dinucleotide
FDG	[^{18}F]-Fluoro-Désoxy-Glucose
fMRI	Functional Magnetic Resonance Imaging
FRET	Förster/Fluorescense Resonance Energy Transfer
GFA/GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
Glo	Glyoxalase
Glycérol-3P	Glycérol-3-Phosphate
GPDH	Glycérol-3-Phosphate DésHydrogénase
GS	Glutamine Synthase
GSH	Thiol-reduced glutathione
GSSG	Disulfide oxidized glutathione
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
GWAS	Genome-Wide Association Studies
H_2O_2	Péroxyde d'hydrogène
HCAR1	HydroxyCarboxylic Acid Receptor 1
HFS	High-Frequency Stimulation
IP_3R	Récepteurs à l'Inositol 1,4,5-triPhosphate
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique

ITR	Inverted Terminal Repeat
Keap1	Kelch-like ECH-Associated Protein 1
KO	Knock-Out
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LDH1/5	Isoforme 1/5 de la Lactate DésHydrogénase
LPS	LipoPolySaccharide
LTP	Long Term Potentiation
MAO	Minus AntiOxidant
MCI	Mild Cognitive Impairment
MCT	Mono-Carboxylate Transporters
N/A	Not Available
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NGS	Natural Goat Serum
NMDA	*N*-Méthyl-D-Aspartate
NO	Monoxyde d'azote
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2
O_2	DiOxygène
$O_2^{\bullet -}$	Anion superoxide
PA	Potentiel d'Action
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDH	Pyruvate DésHydrogénase
PDK4	Pyruvate Déshydrogénase lipoamide Kinase 4
PEG	PolyÉthylène Glycol
PEP	PhosphoÉnolPyruvate
PFA	ParaFormAldéhyde
PFKFB3	6-PhosphoFructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase-3
PHGDH	PHosphoGlycérate DésHydrogénase
Phos-ox	Phosphorylation Oxydative
Pi	Phosphate Inorganique
PKM1/2	Pyruvate Kinase Musculaire 1/2

PMD	Post Mortem Delay
PP	Phosphorylated Pathway
PPI	Pour Préparation Injectable
PS	PhosphatidylSérine
PSAT1	PhosphoSérine AminoTransférase 1
PSD	Post-Synaptic Density
PSPH	PhosphoSérine Phosphatase
Q_{10}	Ubiquinone ou co-enzyme Q_{10}
$Q_{10}H_2$	Ubiquinol
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-	Reverse Transcription (contrôle négatif)
RT-qPCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
s/gHMT	Sérine/Glycine HydroMéthylTransférase
SAM	S-AdénosylMéthionine
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SNC	Système Nerveux Central
SR	Sérine Racémase
SVF	Sérum de Vœu Fœtal
TA	Température Ambiante
TBS	Tris-Buffered Saline
Td-Tomato	Tandem Dimer Tomato
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2
TRPA1	Transient Receptor Potential cation channel, subfamily A, member 1
UPLC	Ultra-high Performance Liquid Chromatrography
WPRE	Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element

CHAPITRE I
INTRODUCTION

INTRODUCTION 9

1. LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE DANS LE CERVEAU 11

1.1. LE GLUCOSE COMME SOURCE D'ÉNERGIE 11
1.2. LES DEMANDES ÉNERGÉTIQUES DU CERVEAU 13
1.2.1. Activité électrique et maintien des gradients ioniques par les pompes ATPases 14
1.2.2. Production et libération de neurotransmetteurs 16
1.2.3. Utilisation d'ATP par les cellules gliales 16
1.3. LES ASTROCYTES ET LES NEURONES PRÉSENTENT DES PROFILS MÉTABOLIQUES DIFFÉRENTS 17
1.3.1. Profil métabolique des neurones 18
1.3.2. Profil métabolique des astrocytes 19
1.4. LE GLUCOSE COMME PRÉCURSEUR DE NOMBREUSES MACROMOLÉCULES 20
1.4.1. Le glucose participe à la lutte anti- … glucose (homéostasie redox) 21
1.4.2. Le glucose participe à la prolifération cellulaire 22
1.4.3. Le glucose participe à la synthèse de neurotransmetteurs 23

2. LES INTERACTIONS NEURONES-ASTROCYTES 25

2.1. INTERACTIONS PHYSIQUES : NEURONES ET ASTROCYTES FORMENT DES SYNAPSES TRIPARTITES 25
2.1.1. La gliotransmission 25
2.1.2. Le recyclage du glutamate 26
2.1.3. L'homéostasie potassique 28
2.2. INTERACTIONS & SIGNALISATIONS MÉTABOLIQUES : L'ÉCHANGE DE MÉTABOLITES ISSUS DU GLUCOSE 28

3. LA MALADIE D'ALZHEIMER 32

3.1. CARACTÉRISATION GÉNÉRALE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 32
3.1.1. Caractérisation anatomopathologique 33
3.1.2. Les prédispositions génétiques associées à la maladie d'Alzheimer 37
3.1.3. Traitements et essais cliniques 38
3.2. L'HYPO-MÉTABOLISME DU GLUCOSE, UN SIGNE PRÉCOCE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 39
3.3. LE MODÈLE MURIN 3XTG-AD POUR L'ÉTUDE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 42
3.3.1. Présentation générale du modèle 42
3.3.2. Les souris 3xTg-AD présentent des déficits synaptiques et cognitifs 45
3.3.3. Le cerveau des souris 3xTg-AD présente des altérations métaboliques 45
3.3.4. Amélioration des déficits synaptiques et cognitifs par la D-sérine 47

4. LE MÉTABOLISME DE LA L-SÉRINE DANS LE CERVEAU 49

4.1. LA BIOSYNTHÈSE DE LA L-SÉRINE DANS LE CERVEAU : LE *PHOSPHORYLATED PATHWAY* 49
4.1.1. Le glucose comme précurseur du PP 49

4.1.2. La biosynthèse de la L-sérine, une affaire d'astrocytes 51
4.2. LES RÔLES DE LA L-SÉRINE DANS LE CERVEAU 53
4.2.1. L-sérine & Glycolyse 54
4.2.2. L-serine & Neurotransmission et métabolisme du carbone 54
4.2.3. L-sérine & Lipides 56
4.2.4. L-sérine & Espèces réactives de l'oxygène 58
4.2.5. L-sérine & Epigénétique 58
4.3. PATHOLOGIES & POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DE LA L-SÉRINE 59
5. PROBLÉMATIQUE 62

1. LE METABOLISME DU GLUCOSE DANS LE CERVEAU

1.1. LE GLUCOSE COMME SOURCE D'ENERGIE

Le glucose est le principal substrat énergétique du cerveau. Obtenu par l'alimentation, il est ensuite métabolisé en trois étapes pour produire de l'ATP (adénosine triphosphate) (Figure I.1). L'ATP, par sa dégradation en ADP (adénosine diphosphate), fournit la majorité de l'énergie nécessaire au cerveau.

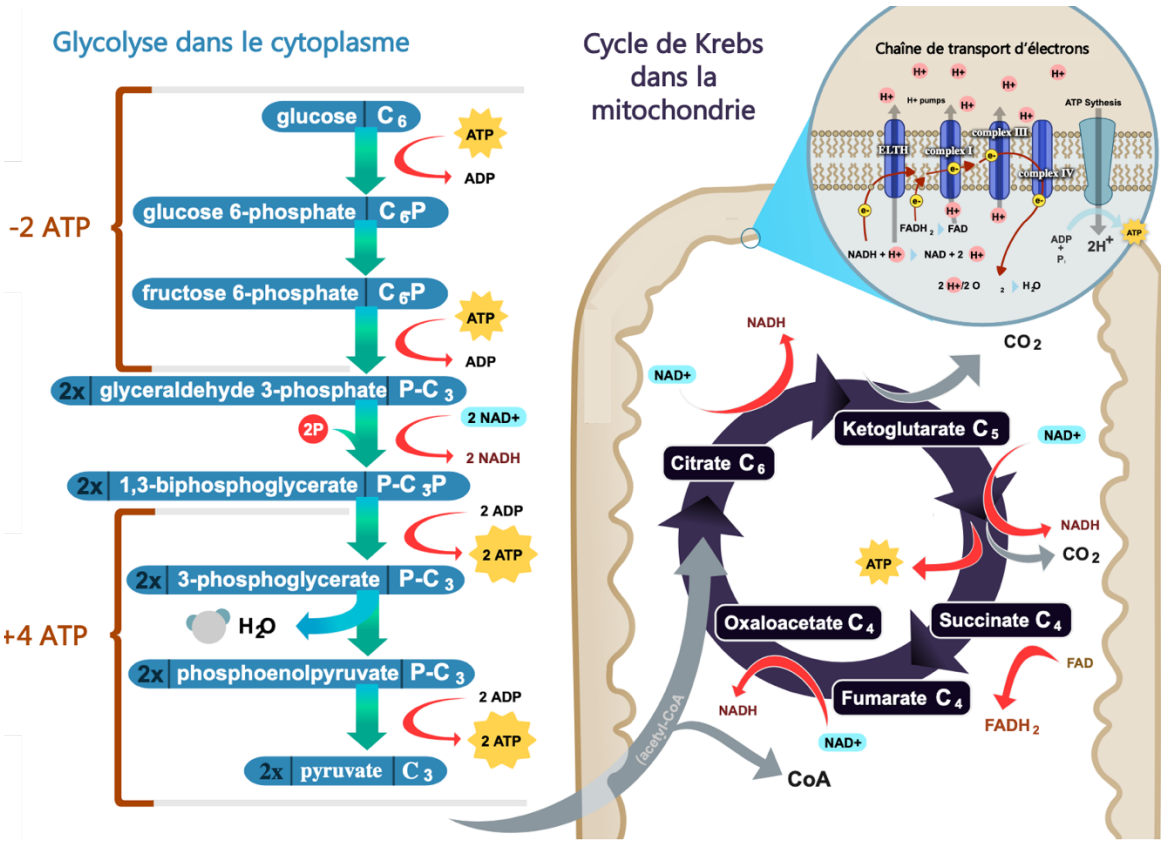


Figure I.1 – Métabolisme du glucose et production énergétique, adaptée de [1]. La glycolyse se déroule dans le cytoplasme et produit du pyruvate. Le pyruvate rejoint la mitochondrie pour alimenter le cycle de Krebs. Les molécules réductrices $NADH,H^+$ et $FADH_2$ sont ensuite converties en ATP le long de la chaîne de transport d'électrons, située dans la membrane interne mitochondriale. Le $NADH,H^+$ produit lors de la glycolyse peut rejoindre la chaîne de transport d'électrons via la navette glycérol-3P (Figure I.2).

La première étape, se déroulant dans le cytoplasme, est la **glycolyse**. Elle débute à partir d'une molécule de glucose et aboutit à la synthèse de 2 molécules de pyruvate, 2 ATP et à la régénération de 2 $NADH,H^+$, après une chaîne de 10 réactions enzymatiques.

Dans la mitochondrie, le pyruvate est transformé en acétyl-coenzyme A (acétylCoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH), libérant une molécule de $NADH,H^+$ et alimentant ainsi le **cycle de Krebs**, correspondant à la deuxième étape. Le cycle de Krebs est une suite de 8 réactions enzymatiques, permettant la régénération de 3 $NADH,H^+$, 1 $FADH_2$ et 1 GTP.

Les molécules $NADH,H^+$ issues de la glycolyse peuvent se rendre dans la mitochondrie pour être converties en ATP. Elles sont capables de passer la membrane mitochondriale externe par diffusion, mais ne peuvent traverser la membrane interne. Pour ce faire, se met en place un transfert d'électrons par oxydo-réduction, l**a navette glycérol-3-phosphate** (Glycérol-3P). Le NADH,H+ est utilisé par la glycérol-3P déshydrogénase (GPDH) soluble pour réduire le dihydroxyacétone phosphate (un intermédiaire de la glycolyse) en glycérol-3P. La membrane mitochondriale interne est équipée d'une GPDH membranaire qui va réaliser la réaction inverse, en utilisant cette fois-ci le FAD+ comme co-facteur et regénérant alors une molécule de $FADH_2$. Cette molécule de $FADH_2$ transfère son pouvoir réducteur à une molécule d'ubiquinone (Q_{10}) par réduction, générant ainsi une molécule d'ubiquinol ($Q_{10}H_2$) à l'intérieur de la mitochondrie (Figure I.2).

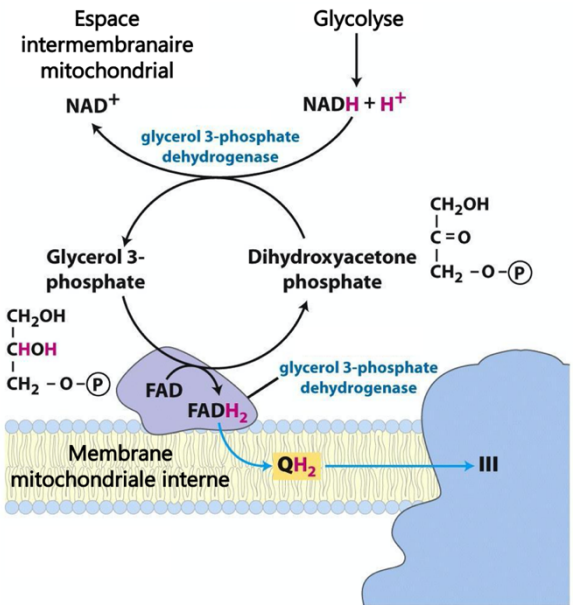


Figure I.2 – Navette glycérol-3P, adaptée de [2]. Le $NADH,H^+$ produit lors de la glycolyse transfère ses électrons au dihydroxyacétone pour former du glycérol-3P. Les électrons continuent d'être transférés jusqu'à l'accepteur final Q_{10}, pour former la molécule réductrice $Q_{10}H_2$, capable d'alimenter le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les molécules réductrices $NADH,H^+$, $FADH_2$ et $Q_{10}H_2$ suivent alors la troisième étape, toujours dans la mitochondrie, la **phosphorylation oxydative** (Phos-ox, chaîne respiratoire mitochondriale, chaîne de transport d'électrons). Au cours de cette dernière étape, les électrons des molécules réductrices sont transférés à des oxydants par les enzymes respiratoires (NAD^+ par la NADH déshydrogénase, FAD^+ par la succinate déshydrogénase, Q_{10} par la cytochrome *c* réductase) le long de la chaîne respiratoire mitochondriale (composée de 4 complexes transmembranaires, I à IV[1]). L'accepteur final d'électrons est le dioxygène, produisant ainsi de l'eau et signifiant que ces réactions ne peuvent se produire qu'en milieu aérobie. Cette succession de transferts correspond à une cascade de réactions d'oxydo-réduction libérant progressivement l'énergie des électrons des réducteurs oxydés. Cette énergie est utilisée par des pompes à protons transmembranaires, générant ainsi un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane. Les protons s'accumulent à l'extérieur de la membrane et leur influx pour rééquilibrer leur distribution entraîne le rotor moléculaire de l'ATP synthase, fournissant l'énergie nécessaire à la conversion de l'ADP en ATP. La phos-ox est essentielle au

[1] Le $NADH,H^+$ alimente le complexe I, le $FADH_2$ le complexe II, la $Q_{10}H_2$ le complexe III et le dioxygène le complexe IV.

métabolisme cellulaire mais génère également des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) tels que l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, potentiellement nocifs pour les cellules (voir section 1.4.1).

Le bilan énergétique de ces étapes successives est résumé en table I.1. L'oxydation complète[2] d'une molécule de glucose, génère 36 molécules d'ATP dans le cerveau[3].

Étapes	Localisation	Substrat	Produits	Conversion	ATP
Glycolyse	Cytoplasme	1 glucose	2 pyruvates 2 $NADH,H^+$ 2 ATP	1 $NADH,H^+$=1 $FADH_2$=1 $Q_{10}H_2$	 2
Cycle de Krebs	Mitochondrie	2 pyruvates	8 $NADH,H^+$ 2 $FADH_2$ 2 GTP	 1 GTP=1 ATP	 2
Phos-ox	Mitochondrie	8 $NADH,H^+$ 2 $FADH_2$ 2 $Q_{10}H_2$	32 ATP	1 $NADH,H^+$=3 ATP 1 $FADH_2$=2 ATP 1 $Q_{10}H_2$=2 ATP	24 4 4
Total					**36**

Table I.1 – Bilan énergétique de la glycolyse aérobie dans le cerveau.

1.2. LES DEMANDES ENERGETIQUES DU CERVEAU

Chez l'être humain, le cerveau représente environ 2% de notre masse corporelle ($m_{cerveau}$=1 300 à 1 500 g). Paradoxalement, il est l'organe le plus consommateur en énergie, puisque 20 à 25% de notre production énergétique lui est dédiée (la moyenne des vertébrés se situant entre 2 et 8%) **[3]**. Le cerveau puise son énergie principalement dans l'oxydation du glucose, comme décrite précédemment. Cependant, lors du développement, dans certaines conditions pathologiques, ou en cas de privation glucidique, le cerveau est capable de métaboliser les corps cétoniques pour subvenir jusqu'à 70% de ses besoins **[4]**.

Les cellules les plus consommatrices en énergie sont les neurones. Bien qu'ils ne représentent que la moitié du nombre total de cellules du cerveau, jusqu'à 75 à 80% de la production énergétique leur est consacrée **[5]**. En effet, l'activité synaptique englobe de nombreux mécanismes coûteux en énergie, largement détaillés par Harris *et al.* en 2012 **[6]**. On dénombre chez l'espèce l'humaine pas moins de 10^{14} à 10^{16} synapses, représentant approximativement 20 000 synapses par neurone. Un tel nombre explique très certainement la forte consommation énergétique du cerveau, comparé aux autres organes.

[2] Par opposition à l'oxydation incomplète du glucose, se déroulant en milieu anaérobie et correspondant à la glycolyse suivie de la fermentation.

[3] Pour certains organes, comme le cœur ou le foie, le bilan énergétique est de 38 molécules d'ATP. En effet, le cerveau utilise la navette glycérol-3P **[315]** qui consomme un équivalent ATP (1 $NADH,H^+$ donne 1 $Q_{10}H_2$ qui donne 2 ATP lors de la phos-ox, alors que le $NADH,H^+$ donne 3 ATP lors de la phos-ox). Le cœur et le foie utilisent, quant à eux, la navette malate-aspartate, plus lente, mais ne consommant pas d'énergie.

1.2.1. ACTIVITE ELECTRIQUE ET MAINTIEN DES GRADIENTS IONIQUES PAR LES POMPES ATPASES

L'activité électrique des neurones engendre de nombreux changements transitoires des concentrations ioniques de part et d'autre de leur membrane. Bien que ces changements ne soient pas consommateurs en énergie *per se*, le retour à un état basal, nécessaire pour l'activité électrique suivante, l'est. Ces rééquilibrages de concentrations concernent principalement les ions Na^+, K^+ et Ca^{2+} et sont réalisés par des pompes ATPases[4], hydrolysant de l'ATP.

Les neurones sont des cellules excitables transportant une information sous forme de potentiels d'action (PA). Le potentiel de repos des neurones se situe aux alentours de -70 mV, et peut monter jusqu'à 50 mV lorsqu'un PA est généré. Celui-ci est dû à un changement de potentiel membranaire, traduit par des échanges d'ions Na^+ et K^+ le long de la membrane. Lorsque des stimuli électriques sont captés par l'arbre dendritique d'un neurone, ceux-ci sont intégrés au niveau du soma et peuvent déclencher, si leur somme dépasse le seuil d'excitabilité du neurone (-55 mV), la génération d'un PA qui se propagera le long de l'axone, dans le but de relayer l'information reçue aux prochains neurones. Pour ce faire, les stimuli électriques entraînent l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants, permettant l'influx massif d'ions Na^+ et dépolarisant ainsi la membrane. Les canaux potassiques, plus lents, s'ouvrent en second, pour permettre l'efflux d'ions K^+ et la repolarisation de la membrane. Ces changements transitoires de potentiel membranaire se propagent de proche en proche le long de l'axone (chaque dépolarisation permettant l'ouverture des canaux potassiques adjacents). Le PA ainsi généré modifie la distribution des ions de part et d'autre de la membrane (des ions Na^+ extracellulaires deviennent intracellulaires et inversement pour des ions K^+). Pour pouvoir générer un autre PA, la membrane doit retrouver son potentiel de repos en rééquilibrant les concentrations ioniques. Le gradient de concentration n'étant pas en faveur de ce rééquilibrage (il y a toujours plus d'ions Na^+ extracellulaires qu'intracellulaires, et inversement pour les ions K^+), un transport actif, *id est*, consommateur d'énergie, doit se mettre en place. Ce transport est réalisé par les pompes Na^+/K^+-ATPase, qui, par la consommation d'une molécule d'ATP, permet l'influx de 2 K^+ et l'efflux de 3 Na^+ (Figure I.3-1).

Une fois arrivé au bouton terminal, le PA suscite l'exocytose de neurotransmetteurs. Pour permettre l'exocytose, un influx d'ions Ca^{2+} doit être réalisé grâce à des canaux calciques voltage-dépendants. Une fois de plus, cela génère un déséquilibre ionique de part et d'autre de la membrane, qui doit ensuite être compensé pour permettre la libération de nouveaux neurotransmetteurs. Un transport actif de Ca^{2+} est donc mis en place, via les pompes Ca^{2+}-ATPases (Figure I.3-2)

L'exocytose de neurotransmetteurs nécessite au préalable de les charger grâce à des transporteurs, dans des vésicules pré-synaptiques. Par exemple, l'accumulation de glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central (SNC),

[4] Il existe quatre types d'ATPases, classées selon qu'elles consomment ou produisent de l'ATP et en fonction des ions qu'elles transportent. Le type F produit de l'ATP et est activé par l'influx de protons (ATP synthase), le type P consomme de l'ATP pour maintenir un potentiel membranaire en transportant des ions contre leur gradient de concentration (uniport *(une seule espèce ionique dans un seul sens)* Ca^{2+}-ATPase, antiport *(deux espèces ioniques dans deux sens opposés)* Na^+/K^+-ATPase) et le type V hydrolyse de l'ATP pour créer un gradient de protons afin de maintenir un pH acide dans un organite (H^+-ATPase).

dans les vésicules synaptiques est réalisée par les transporteurs vGLUT (1 à 3), dépendants du gradient de protons. Ce gradient est mis en place par des pompes à protons H^+-ATPase afin d'acidifier le milieu intra-vésiculaire (Figure I.3-4).

Les neurotransmetteurs se fixent sur des récepteurs-canaux chimio-dépendants au niveau de l'élément post-synaptique, déclenchant leur ouverture et l'influx d'ions (Ca^{2+} ou Na^+ la plupart du temps). Ici aussi, le retour à l'équilibre nécessite l'action d'une pompe ATPase pour rétablir les concentrations ioniques (efflux de Na^+ ou stockage du Ca^{2+} dans le réticulum) (Figure I.3-6).

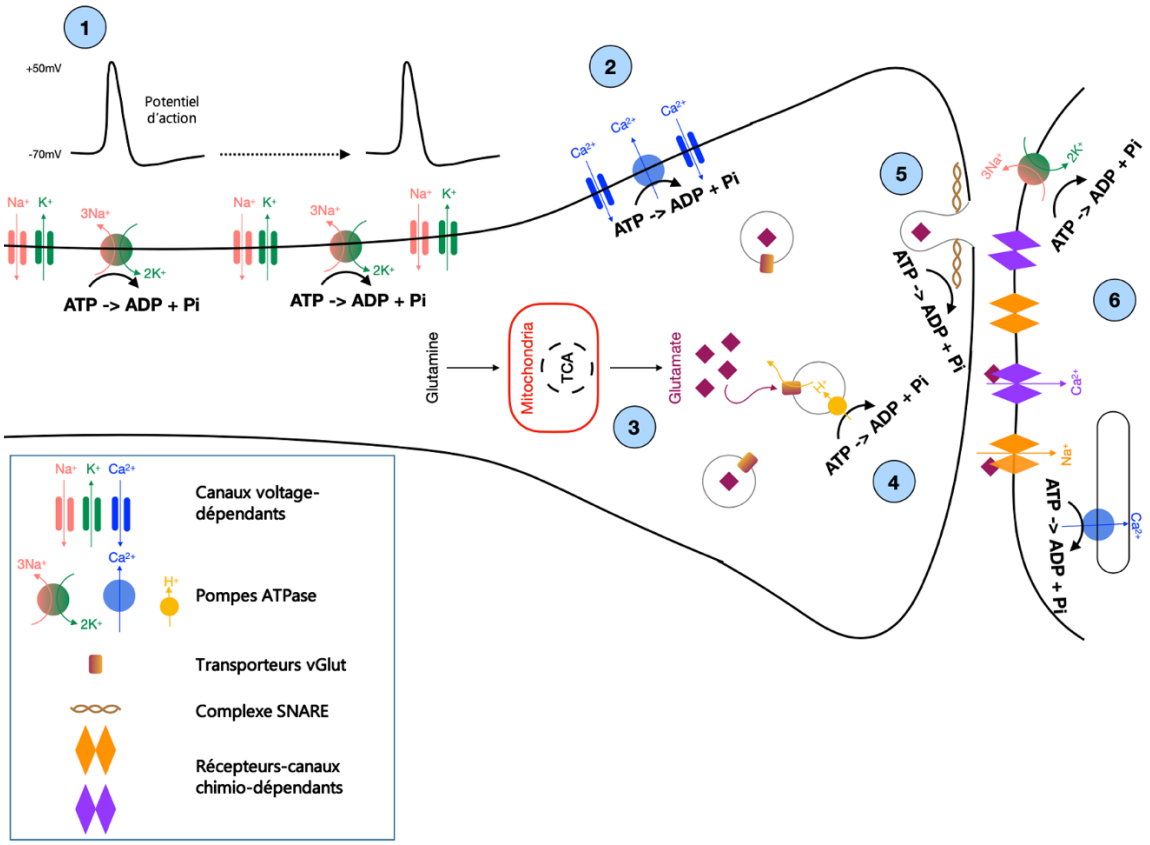


Figure I.3 – Représentation schématique d'une synapse glutamatergique, adaptée de [1]. Les synapses glutamatergiques représentent 90% des synapses corticales et sont à la base de la communication rapide. **1 -** La propagation des PA le long de l'axone requiert l'action des pompes Na^+/K^+-ATPase pour rééquilibrer les gradients ioniques. **2 -** Au niveau du bouton terminal, les PA sont convertis en influx calciques. Les pompes Ca^{2+}-ATPase permettent ensuite de rééquilibrer les gradients ioniques. **3 -** Le glutamate est produit à l'aide du cycle de Krebs dans la mitochondrie. **4 -** Le glutamate est accumulé dans des vésicules à l'aide des transporteurs vGLUT dépendants du gradient de protons. Ce gradient est généré par l'action des pompes H^+-ATPase. **5 -** Les vésicules contenant le glutamate fusionnent avec la membrane plasmique synaptique créant ainsi des complexes SNARE. La dissociation de ces complexes nécessite la consommation d'ATP. **6 -** Dans la fente synaptique, le glutamate se fixe à des récepteurs-canaux post-synaptiques permettant l'influx d'ions. Des pompes ATPases permettent ensuite de rééquilibrer la distribution des ions.

1.2.2. PRODUCTION ET LIBERATION DE NEUROTRANSMETTEURS

La production de neurotransmetteurs est consommatrice d'énergie, dans le sens où leur synthèse peut utiliser comme substrat des intermédiaires du métabolisme énergétique, qui ne pourront donc servir à la production d'énergie (voir section 1.4.3). A titre d'exemple, le glutamate est produit à partir de la glutamine (synthétisée dans les astrocytes) et de l'α-cétoglutarate (α-KG), produit lors du cycle de Krebs.

Lors de la fusion des vésicules à la membrane plasmique synaptique, pour la libération des neurotransmetteurs qu'elles contiennent, un complexe SNARE (*soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) se met en place. Post-exocytose, ce complexe doit être dissocié. Ce démantèlement nécessite la consommation d'une molécule d'ATP (Figure I.3-5).

Les molécules d'ATP, en tant que telles, peuvent également être empaquetées dans des vésicules pour servir de neurotransmetteur. Elles agissent alors sur des récepteurs spécifiques et induisent un courant post-synaptique excitateur **[7]**.

1.2.3. UTILISATION D'ATP PAR LES CELLULES GLIALES

Les 20% d'énergie restant à disposition des cellules gliales sont utilisés de façon différente en fonction des cellules. Cependant, les mécanismes coûteux en énergie de ces cellules sont beaucoup moins étudiés que ceux des neurones, rendant leur listage exhaustif ardu. En voici néanmoins quelques exemples.

Les astrocytes participent au recyclage des neurotransmetteurs, en les récupérant après leur utilisation, dans la fente synaptique. Le glutamate est récupéré par le transporteur du glutamate EAAT2[5] (GLT1). Cet influx de glutamate est accompagné d'un influx d'ions Na^+, modifiant ainsi la concentration intracellulaire, qu'une pompe Na^+/K^+-ATPase doit ensuite rééquilibrer (voir section 2.1.2).

Les astrocytes et les microglies ont la capacité de libérer des molécules d'ATP comme molécules de signalisation. Par exemple, l'activation des microglies par le LPS (lipopolysaccharide), molécule bactérienne pro-inflammatoire, entraîne la libération d'ATP par les microglies. Celle-ci stimule les astrocytes qui libèrent du glutamate afin de moduler la transmission synaptique via des récepteurs métabotropiques au glutamate neuronaux **[8]**. Les astrocytes peuvent également moduler la transmission synaptique en libérant directement de l'ATP **[9]**.

Les microglies sont des cellules mobiles, qui inspectent le parenchyme cérébral afin de s'assurer de son intégrité. Ces déplacements requièrent une dynamique du cytosquelette, via notamment la polymérisation-dépolymérisation des filaments d'actine, mécanisme nécessitant la consommation d'ATP. A l'état quiescent, les microglies dépendent du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative pour subvenir à leurs besoins énergétiques. Lorsqu'elles deviennent réactivent et pro-inflammatoires, leur métabolisme s'oriente vers la voie du pentose phosphate et la production de lactate, obtenant alors leur énergie via la glycolyse principalement **[10]**. Par ailleurs, en cas de

[5] Cette famille de transporteurs comprend des sous-types allant de 1 à 5, mais seuls les sous-types 1 (GLAST) et 2 (GLT1) sont exprimés par les astrocytes **[316]**. Le sous-type 2 est responsable de 90% du recyclage du glutamate **[317]**.

perturbation de l'homéostasie du glucose, comme cela peut être le cas dans certaines pathologies, les microglies sont capables d'alimenter leur cycle de Krebs à partir de la glutamine. Cette plasticité leur permet ainsi de maintenir leur rôle de surveillance et de phagocytose, même en conditions hostiles [11].

Les oligodendrocytes sont des cellules spécialisées dans la myélinisation des axones. La myéline est composée à 70% de lipides et 30% de protéines. Les constituants de ces lipides et protéines sont synthétisés majoritairement à partir d'intermédiaires du métabolisme énergétique (voir section 1.4.2). Comme pour la synthèse de neurotransmetteurs, la synthèse de myéline par les oligodendrocytes dévie les intermédiaires de la glycolyse [12].

Ainsi, les neurones sont les principaux consommateurs d'énergie dans le cerveau, majoritairement via la transmission synaptique. La transmission synaptique n'étant pas un processus continu et homogène dans le cerveau, la question se pose de savoir comment est régulé l'apport en fonction de la demande. Rangaraju *et al.* ont émis l'hypothèse en 2014 de l'existence de certains mécanismes afin d'adapter la production d'énergie à l'activité électrique locale [13]. En effet, à l'aide d'un rapporteur génétiquement encodé de l'ATP pré-synaptique, ils suggèrent que l'activité glycolytique seule serait suffisante pour fournir l'ATP nécessaire à l'activité basale des neurones. Néanmoins, en cas d'activité synaptique, les flux glycolytique, du cycle de Krebs et de la phos-ox augmenteraient pour répondre à l'accroissement des besoins énergétiques.

1.3. Les astrocytes et les neurones presentent des profils metaboliques differents

L'hétérogénéité cellulaire et fonctionnelle du cerveau suggère des différences en terme de profil métabolique entre toutes ces cellules. Ces différences ont été particulièrement étudiées entre les neurones et les astrocytes, alors que beaucoup reste à découvrir pour les autres types cellulaires. Néanmoins, la recherche actuelle commence à s'intéresser activement au profil métabolique des microglies (voir section 1.2.3, références [10], [11]). Cette section résume les découvertes et hypothèses concernant les profils métaboliques des neurones et des astrocytes.

L'idée d'une différence métabolique entre neurones et astrocytes a émergé dans les années 1960, lorsque Hydén a montré, en utilisant des cellules isolées après dissection, que la production de CO_2 est plus élevée dans les neurones que dans les astrocytes. De plus, en étudiant l'activité de la succinoxidase (complexe enzymatique du cycle de Krebs), Hydén a mis en évidence les caractères glycolytique des astrocytes et oxydatif des neurones [14], [15]. Les cultures de cellules *in vitro* présentant de nombreuses limites à l'extrapolation *in vivo*, il aura fallu attendre le développement récent de nouvelles techniques pour pouvoir en tirer de nouvelles informations. Par exemple, les études transcriptomiques sur cellules triées murines et humaines ont permis de corroborer les caractères glycolytique des astrocytes et oxydatif des neurones, en révélant les différents isoformes et leurs niveaux d'expression des enzymes de ces voies dans chaque type cellulaire [16]–[18]. Les modélisations obtenues après spectroscopie par résonance magnétique et imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (fMRI) sur rongeurs et humains confirment l'existence de profils métaboliques distincts, mais complémentaires

entre neurones et astrocytes [19], [20]. Les hypothèses actuelles concernant ces profils métaboliques (Figure I.4) sont détaillées dans les sous-sections suivantes. Un des challenges actuels du domaine de la neuro-énergétique est de réussir à combiner et intégrer les données obtenues à différentes échelles de résolution afin d'obtenir une image la plus réaliste possible du métabolisme énergétique du cerveau.

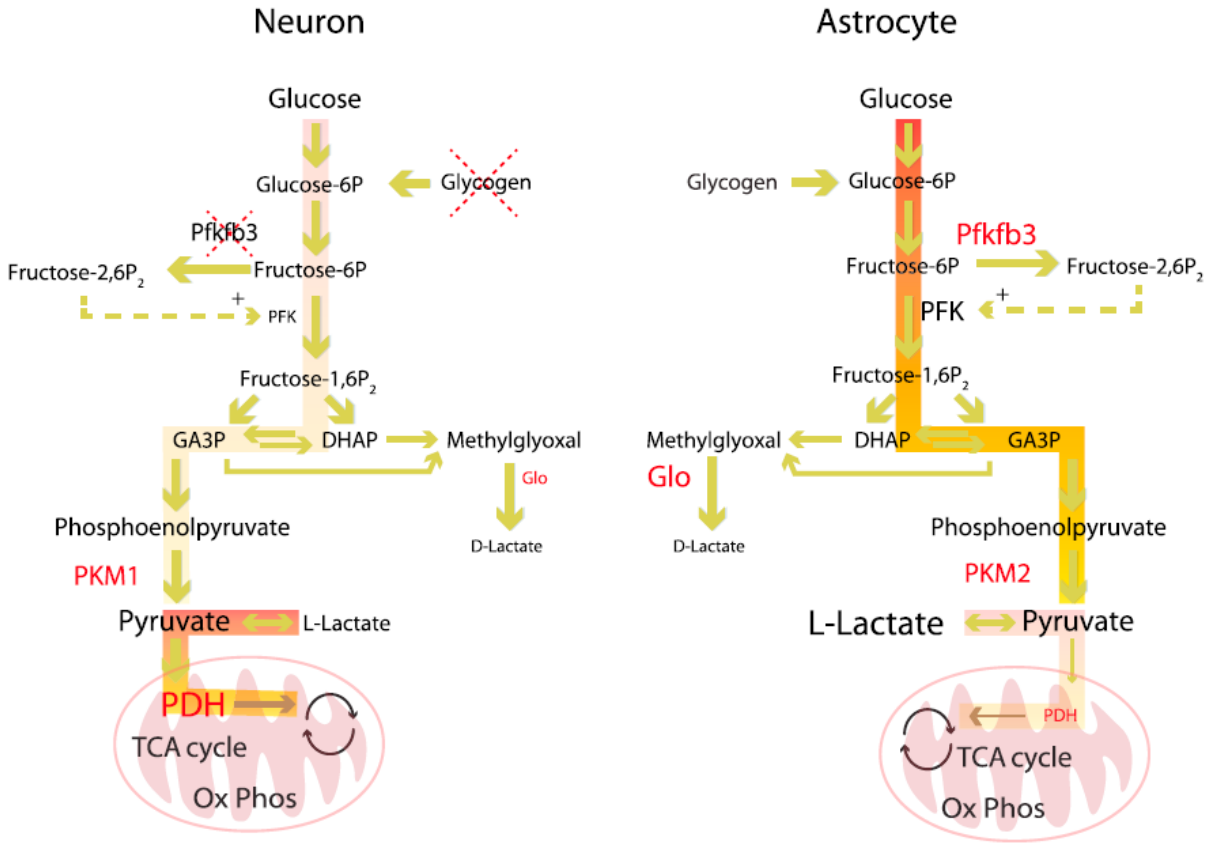


Figure I.4 – Comparaison des profils métaboliques entre neurones et astrocytes [21]. **PFKFB3** : 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3 ; **Glo** : Glyoxalase ; **PKM1/2** : Isoforme 1/2 de la pyruvate kinase musculaire ; **PDH** : Pyruvate déshydrogénase ; **TCA cycle** : Cycle de Krebs ; **Ox Phos** : Phosphorylation oxydative.

1.3.1. Profil metabolique des neurones

Les neurones ne possèdent pas de réserve intracellulaire de glycogène. En effet, bien que les neurones expriment l'enzyme glycogène synthétase, celle-ci est continuellement dégradée. Ils alimentent donc leur flux glycolytique à partir du glucose, qu'ils sont capables d'extraire de leur environnement majoritairement à l'aide du transporteur haute-affinité au glucose GLUT3 [22].

Les études biochimiques réalisées sur des neurones du cortex de souris ont montré l'absence de l'enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3 (PFKFB3), modulant la glycolyse. Elle est la cible d'ubiquitinations l'envoyant constamment au protéasome pour dégradation [23]. Rodriguez-Rodriguez *et al.* ont montré en 2012 que forcer son expression neuronale *in vitro* engendre l'activation de la glycolyse au détriment de la voie du pentose phosphate, résultant en un taux élevé de mort neuronale par

apoptose [24]. La glycolyse produit du méthyglyoxal, une molécule générant du stress oxydatif pour les cellules. Elle est dégradée par la glyoxalase (Glo), qui n'est que faiblement exprimée par les neurones *in vitro* et *in vivo* [25], mais toutefois transcrite par les neurones humains [16]. Ainsi, activer la glycolyse dans les neurones entraînerait à la fois l'augmentation du stress oxydatif et la perte des moyens leur permettant de lutter contre. Ensemble, ces résultats corroborent le caractère oxydatif des neurones, qui métaboliseraient principalement le glucose via la voie du pentose phosphate afin de lutter contre le stress oxydatif (voir section 1.4.1) et possèderaient un flux glycolytique constant pour répondre à leurs besoins minimaux [21], [23].

La lactate déshydrogénase (LDH) agit à la jonction entre la glycolyse et le cycle de Krebs, catalysant l'interconversion du lactate en pyruvate et régulant ainsi la biodisponibilité de ces métabolites en fonction de la disponibilité en oxygène. Elle existe sous différents isoformes dont LDH 1 (LDH-B, LDH cardiaque) et LDH 5 (LDH-A, LDH musculaire). En 1996, Bittar *et al.* ont préparé les premiers anticorps spécifiques de ces isoformes. Par immunohistochimie, ils ont montré que les neurones du cerveau humain expriment l'isoforme 1 [26]. Ces observations ont été confirmées en 2014 par Duka *et al.* via des études biochimiques sur les fractions synaptosomales isolées d'homogénats du striatum et du néocortex de différents primates (dont l'humain[6]) [27]. L'isoforme 1 est inhibé par le pyruvate et favorise donc sa production à partir du lactate. Ainsi, bien que les neurones possèdent un taux de glycolyse faible, la production de pyruvate nécessaire à l'alimentation du cycle de Krebs semble pouvoir être assurée à partir du lactate.

L'efficacité de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons, responsable de la phos-ox, dépend de son organisation. En effet, les différents complexes la composant peuvent être plus ou moins libres. Lopez-Fabuel *et al.* ont montré en 2016 que les neurones, isolés du cortex de souris et en culture primaire, présentent une organisation du complexe I en supercomplexes. Cette organisation permet une meilleure efficacité de la chaîne respiratoire, mais également une production minimale de ROS [28].

1.3.2. Profil metabolique des astrocytes

Les astrocytes, quant à eux, privilégieraient largement la glycolyse à la voie du pentose phosphate [29], s'appuyant sur d'autres mécanismes pour régénérer leur NADPH (voir section 1.4.1). Ils sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins pour y extraire le glucose à l'aide du transporteur au glucose GLUT1 et possèdent des réserves intracellulaires de glycogène pouvant être mobilisées via leur hydrolyse en glucose-6-phosphate.

Contrairement aux neurones, l'enzyme PFKFB3 est abondamment présente dans les astrocytes [30], leur permettant ainsi une régulation fine de leur flux glycolytique [31]. En effet, *in vitro*, l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les astrocytes engendre une augmentation importante du flux glycolytique pour répondre à leurs besoins énergétiques [32]. Cette modulation est impossible si PFKFB3 est préalablement inhibée par ARN interférence [30]. Les astrocytes sont équipés pour lutter contre le méthylglyoxal, puisqu'ils expriment Glo *in vivo* et *in vitro* [25].

[6] Les auteurs montrent également que les cerveaux humains possèdent un ratio LDH1/LDH5 très élevé, suggérant une augmentation de l'expression de LDH1 au cours de l'évolution des primates.

La pyruvate kinase musculaire (PKM) est responsable de la dernière étape de la glycolyse, produisant ainsi le pyruvate. Les études transcriptomiques montrent que les astrocytes exprimeraient préférentiellement l'isoforme 2, spécifique des cellules prolifératrices [33], alors que les neurones seraient équipés de l'isoforme 1 [16], [17]. PKM2 présente un site d'activation allostérique [34], contrairement à PKM1, suggérant sa capacité à bloquer la synthèse de pyruvate en l'absence d'activateur, pour favoriser l'accumulation d'intermédiaires glycolytiques (voir section 4.2.1).

L'idée que la phos-ox ne serait que peu active et/ou efficace dans les astrocytes est étayée par plusieurs observations. Les astrocytes expriment la LDH5 [26], favorisant la conversion de pyruvate en lactate. PDH, l'enzyme contrôlant l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs, n'est que faiblement active dans les astrocytes en culture [35]. Enfin, le complexe I de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale est libre dans les astrocytes, diminuant son efficacité et accroissant la production de ROS [28].

Ensemble, ces résultats corroborent le caractère glycolytique des astrocytes, qu'ils sont capables de finement réguler. Leurs voies énergétiques mitochondriales semblent faibles pour répondre à leurs besoins minimaux mais non essentielles.

Ainsi, bien que ces deux types cellulaires soient capables d'extraire et de métaboliser le glucose, ils le feraient dans des buts différents. Les neurones, incapables de réguler leur flux glycolytique, dirigent le glucose principalement vers la voie du pentose phosphate pour régénérer le NADPH, au détriment de la synthèse d'énergie. Ils peuvent obtenir leur énergie via une faible activité glycolytique et la partie oxydative du métabolisme énergétique, alimentée par du pyruvate issu du lactate. Les astrocytes, quant à eux, ne dépendraient que peu des voies énergétiques mitochondriales. Ils semblent profiter d'une glycolyse aérobie massive pour subvenir à leurs besoins énergétiques, produire du lactate et accumuler des intermédiaires glycolytiques.

Bien que ces différences en terme de profil métabolique soient largement étayées, elles n'en restent pas moins que des hypothèses. En effet, les données obtenues résultent principalement d'études hors contexte physiologique (*in vitro*, *ex vivo*) ou de modélisations. Si elles semblent fortement probables, certaines questions restent en suspens : ces profils sont-ils généraux et présents dans tous les sous-types d'astrocytes et de neurones ? Sont-ils fixes au cours de la vie de la cellule ? Comment sont-ils impactés en conditions pathologiques ? Répondre à ces questions fait partie intégrante de la recherche actuelle en neuro-métabolisme.

1.4. Le glucose comme precurseur de nombreuses macromolecules

Comme succinctement évoqué précédemment, les cellules peuvent favoriser la synthèse de certaines molécules au détriment du métabolisme énergétique. Ces molécules peuvent être regroupées dans différentes catégories, la lutte anti-oxydante, la prolifération cellulaire et la synthèse de neurotransmetteurs, résumées subséquemment.

1.4.1. LE GLUCOSE PARTICIPE A LA LUTTE ANTI- … GLUCOSE (HOMEOSTASIE REDOX)

Le glucose, en alimentant la phos-ox, est responsable de la génération des ROS. Parmi ces ROS, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2[7] peut oxyder les protéines, lipides et acides nucléiques, modifiant ainsi leurs fonctions et pouvant les rendre toxiques jusqu'à entraîner la mort cellulaire [36]. Le glutathion est une des molécules principales de la lutte anti-oxydante. C'est un tripeptide (γ-L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine) dérivé du glutamate, de la cystéine et de la glycine (Figure I.5). Il existe sous forme réduite (GSH, prédominante) et sous forme oxydée (GSSG). La forme oxydée est obtenue à partir de la forme réduite après réduction des protéines oxydées par la glutathion péroxydase et donc détoxification de ces protéines. Pour pouvoir réduire d'autres protéines, le GSSG doit être régénéré en GSH par l'enzyme glutathion réductase, qui consomme une molécule de NADPH (Figure I.5) [37].

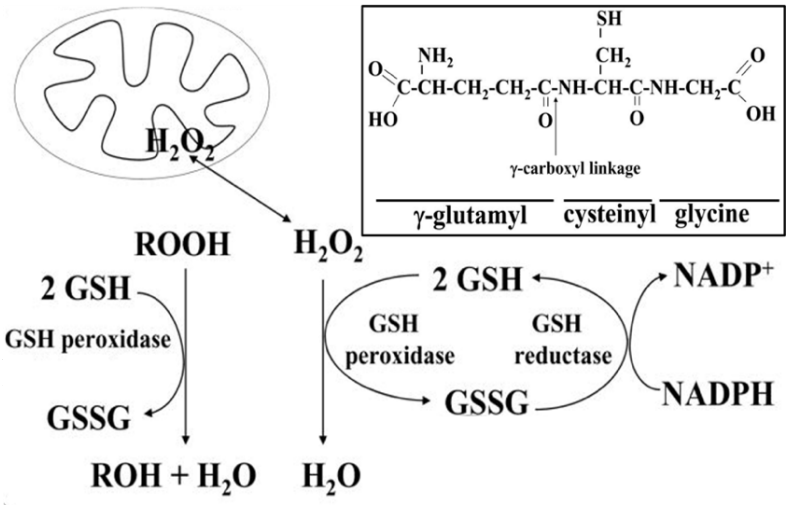


Figure I.5 – Le GSH est le principal antioxydant, adaptée de [37]. H_2O_2 et les radicaux oxydés (ROOH) peuvent être réduits par la GSH péroxydase dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie. Le GSSG ainsi formé retrouve sa forme réduite GSH par la GSSG réductase, utilisant le NADPH comme co-facteur. **Encart** en haut à doite, formule chimique du GSH.

Le glucose est primordial à l'homéostasie redox, d'une part parce qu'il est nécessaire à la production du glutathion (précurseur du glutamate, de la cystéine et de la glycine, (voir section 1.4.2) et d'autre part parce qu'il participe à la régénération du NADPH. La voie la plus directe pour produire du NADPH est la partie oxydative de la voie du pentose phosphate (Figure I.6-Gauche). Comme décrit précédemment, le glucose est préférentiellement consommé via cette voie dans les neurones [23], alors que ce n'est pas le cas dans les astrocytes [29]. Cependant, Fan *et al.* ont montré en 2014 que le cycle du folate (Figure I.6-Droite) représente également une voie de régénération du NADPH importante [38]. Voie que les astrocytes peuvent tout à fait utiliser, puisqu'ils produisent de la L-sérine (voir section 4.1.2), essentielle pour alimenter le cycle, et expriment l'enzyme ALDH1L1[8]. La L-sérine étant elle-même dérivée du glucose (voir sections 1.4.2 et 4.1.1).

[7] Résultat direct de la phos-ox ou de la dégradation du $O_2^{\bullet -}$ par la superoxyde dismutase.
[8] ALDH1L1 est d'ailleurs un marqueur d'identité astrocytaire.

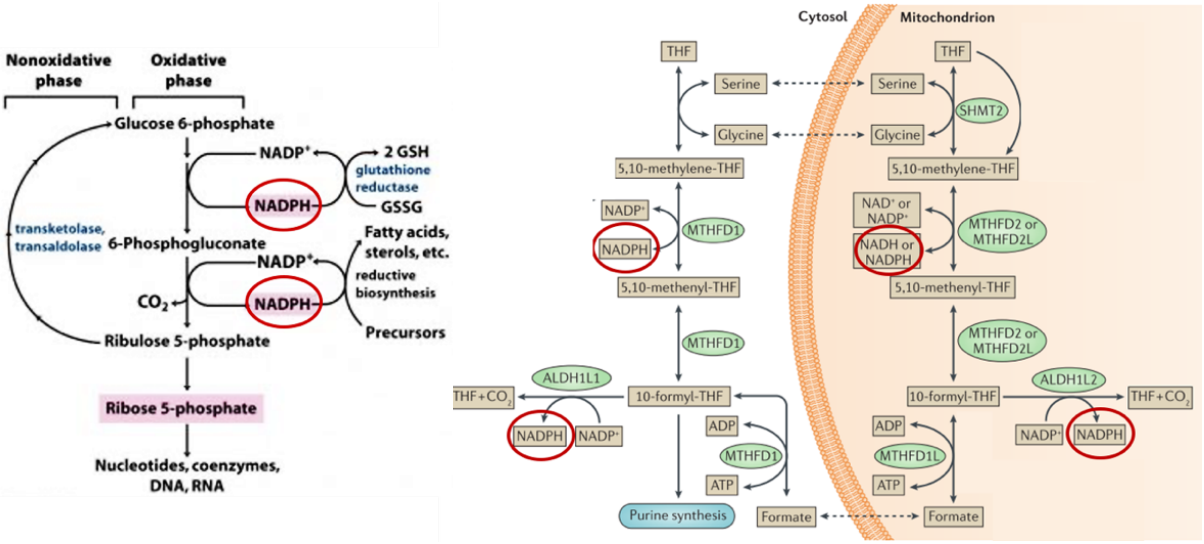


Figure I.6 – Voie du pentose phosphate et cycle du folate, adaptée de [2] et [20]. A gauche, la voie du pentose phosphate, à droite, le cycle du folate pour la régénération du NADPH. La voie du pentose phosphate démarre à partir du glucose-6-phosphate, obtenu après la première réaction enzymatique de la glycolyse. Le cycle du folate nécessite la L-sérine, dérivée du glucose comme co-facteur. **Encerclé** en rouge, les molécules de NADPH produites.

1.4.2. Le glucose participe a la proliferation cellulaire

Cette catégorie regroupe trois différents types de molécules, les nucléotides, les lipides et les acides aminés, appelées biomasse de précurseurs. Ces molécules, dérivées du métabolisme du glucose, sont essentielles à la survie cellulaire, mais partagent également le fait d'être primordiales pour la prolifération cellulaire. Par exemple, le flux glycolytique, mais pas la phos-ox, est largement augmenté dans de nombreuses cellules cancéreuses, pour permettre leur synthèse et donc, le développement de la tumeur (effet Warburg[9], [40], [41]). Le rôle du glucose dans la prolifération cellulaire a été largement détaillé par Lunt *et al.* en 2011 [42], en voici quelques exemples (Figure I.7).

Générer une cellule fille par division cellulaire requiert la réplication de tous les composants cellulaires de la cellule mère. La survie d'une cellule dépend également de la dynamique de renouvellement de ses composants. Le glucose peut fournir les précurseurs de la majorité de ces constituants. Les nucléotides, briques constitutives de l'ADN et l'ARN, dérivent du glucose-6-phosphate. Nombreux acides aminés (alanine, aspartate, glutamate, proline, arginine, glutamine), briques constitutives des protéines, dérivent du pyruvate. Enfin, la sérine dérive du 3-phoshoglycérate (3PG) et peut être convertie en sérine et cystéine. La sérine est également le précurseur de la céramide, le squelette moléculaire commun à tous les sphingolipides. Les phospholipides dérivent du glycéraldéhyde-3-phosphate. Ces lipides sont essentiels pour la constitution des membranes cellulaires et impliqués dans certaines cascades de signalisation. Par exemple, la phosphatidylsérine (PS, phospholipide dont le groupe phosphate est lié à la serine) joue un rôle prépondérant

[9] L'effet Warburg est défini comme la production de lactate à partir du pyruvate en milieu aérobie. Si bien que la glycolyse est active, mais n'alimente pas les voies énergétiques mitochondriales. Il est d'ailleurs à noter que l'effet Warburg est caractéristique du métabolisme des astrocytes (voir section 1.3.2).

dans le cerveau, régulant l'apoptose, activant de nombreuses voies de phosphorylation, accumulant des vésicules chargées de neurotransmetteurs, etc. (voir [43] pour une revue détaillée des rôles de la PS dans le cerveau).

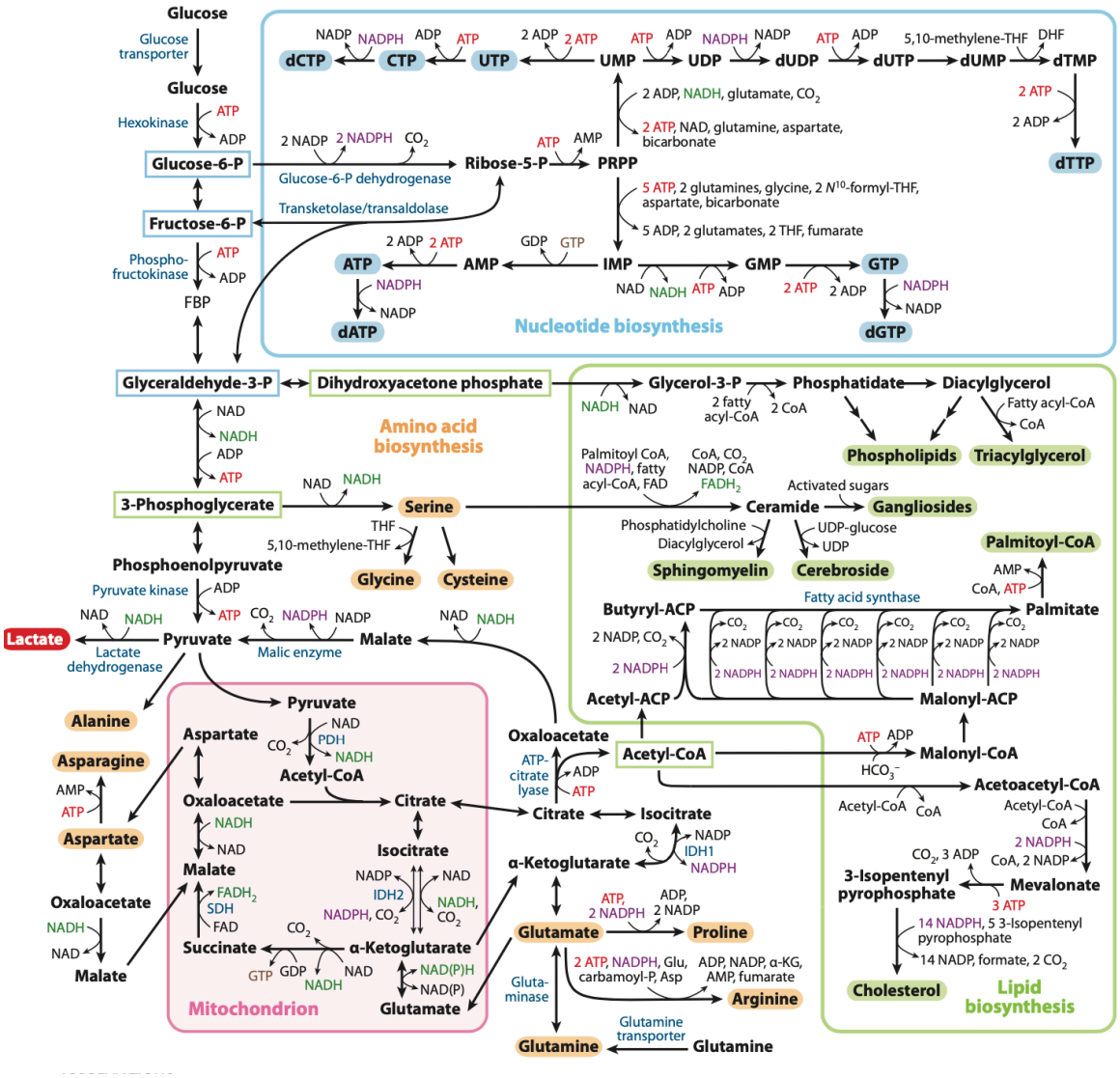


Figure I.7 – Les voies métaboliques actives dans les cellules prolifératrices, [42]. Représentation de la contribution de la glycolyse, de la phos-ox, de la voie du pentose phosphate et du métabolisme de la glutamine dans la production de la biomasse de précurseurs. **Bleu foncé**, les enzymes contrôlant des étapes critiques de ces voies et étant souvent sur-exprimées ou mutées dans les cellules cancéreuses. **Bleu clair**, nucléotides incorporés dans l'ADN et l'ARN. **Vert**, lipides. **Orange**, acides aminés non-essentiels. **Encadrés**, les métabolites essentiels pour la production de la biomasse de précurseurs.

1.4.3. Le glucose participe a la synthese de neurotransmetteurs

Comme décrit précédemment, la neurotransmission est un mécanisme nécessitant forcément du glucose pour répondre à la dépense énergétique. Néanmoins, ce n'est pas la seule manière dont le glucose participe à la neurotransmission. En effet, le glucose est

le précurseur de certains neurotransmetteurs et neuromédiateurs, essentiels pour la neurotransmission.

Le glutamate, est produit à partir de la glutamine et de l'α-KG, ce-dernier étant un intermédiaire du cycle de Krebs. La glycine, principal neurotransmetteur inhibiteur de la moelle épinière, est obtenue après conversion de la L-sérine par la s/gHMT (sérine/glycine hydroxyméthyltransférase), la L-sérine étant produite à partir du 3PG, un intermédiaire de la glycolyse. Le GABA (acide γ-amino-butyrique), principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau, est obtenu à partir du glutamate. L'acétylcholine (Ach), neurotransmetteur musculaire excitateur, est obtenu à partir de l'acétylCoA, produite, notamment, par la PDH à l'entrée du cycle de Krebs.

L'ATP, la glycine et la D-sérine sont également des neuromodulateurs. La D-sérine est obtenue par racémisation de la L-sérine par la sérine racémase (SR). La glycine et la D-sérine sont des co-agonistes des récepteurs au glutamate NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) (voir section 2.1.1).

Le glucose permet également la synthèse de lactate, à partir du pyruvate. Les rôles du lactate ainsi que son origine cellulaire dans le cerveau sont plus précisément détaillés en section 2.2.

En conclusion, bien que le glucose soit essentiel à la production d'énergie, il l'est également pour la synthèse de nombreuses macromolécules. Les sections suivantes s'attacheront à détailler les interactions métaboliques entre neurones et astrocytes, puisqu'ils ne présentent pas les mêmes profils métaboliques. Il s'agira ensuite de démontrer le rôle prépondérant du métabolisme du glucose dans la maladie d'Alzheimer, avec un focus tout particulier sur la synthèse de la L-sérine et ses multiples rôles.

2. LES INTERACTIONS NEURONES-ASTROCYTES

Rudolf Virchow fut le premier, en 1856, à avancer l'idée de l'existence d'une autre substance que les neurones dans le cerveau, dont il détaillera les caractéristiques en 1858. Il proposa le concept de *Nervenkitt* (de l'allemand « *Nerven,* nerfs » et « *Kitt*, mastic ») comme étant la substance connective dans laquelle les neurones sont intégrés [44]. Par la suite, *Nervenkitt* a donné « Nevraglie » ou « Neuroglie », puis simplement « Glie » à partir du grec « *Gloios*, visqueux, gélatine ». Le terme « astrocyte » apparaît en 1895, par Michael von Lenhossék pour rendre compte de la forme étoilée des cellules constituant cette neuroglie. En 1919, les oligodendrocytes et les microglies furent séparés des astrocytes.

Depuis leur découverte, de plus en plus d'études s'attachent à démontrer que les cellules gliales remplissent de nombreuses fonctions essentielles pour le cerveau, aussi bien en conditions physiologiques qu'en conditions pathologiques [45]. Les sections suivantes s'intéresseront aux interactions entre neurones et astrocytes, dans des conditions physiologiques et post-développementales, avec un focus tout particulier sur les multiples rôles des astrocytes. Pour une revue extrêmement détaillée sur les astrocytes, leur historique, leur hétérogénéité, leur constitution et leurs fonctions, voir [46].

2.1. INTERACTIONS PHYSIQUES : NEURONES ET ASTROCYTES FORMENT DES SYNAPSES TRIPARTITES

En 1999, le concept de synapse s'est complexifié avec la découverte des synapses tripartites[10] [47]. Les astrocytes sont en relation étroite avec les synapses à l'aide de leurs prolongements. Cette relation est extrêmement difficile à observer, puisque les prolongements terminaux des astrocytes, les plus fins (0.03 à 0.05 µm), sont sous la limite de diffraction des microscopes conventionnels (0.3 à 1.0 µm) [48]. Le développement de la microscopie électronique, couplée à la reconstruction 3D, a permis de mettre en évidence cette synapse tripartite (Figure I.8), suggérant un rôle des astrocytes dans la transmission synaptique. Depuis plusieurs années, de nombreuses recherches ont montré que les astrocytes, localisés dans plusieurs régions du cerveau, seraient activés par les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique et capables d'y répondre [49]–[51].

2.1.1. LA GLIOTRANSMISSION

Les astrocytes expriment à leur surface une large variété de récepteurs aux neurotransmetteurs couplés aux protéines G [52], capables de déclencher différentes cascades de signalisation intracellulaires. L'activation de ces récepteurs, en réponse à l'activité neuronale adjacente, serait responsable d'influx calciques astrocytaires (Figure I.8-2 & 3). Ces fluctuations calciques participeraient très certainement à la libération de gliotransmetteurs et permettraient ainsi la modulation de la transmission synaptique [53] (Figure I.8-4). Les mécanismes sous-tendant ces influx calciques sont encore complexes. Bien qu'on sache qu'ils soient très localisés au niveau des prolongements astrocytaires [54], ils pourraient être dus à la fois aux récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3R) situés

[10] La synapse tripartite est principalement glutamatergique et localisée dans l'hippocampe.

au niveau du réticulum endoplasmique[11] et/ou aux récepteurs TRPA1 (*Transient Receptor Potential cation channel, subfamily A, member 1*) situés au niveau de la membrane plasmique **[55]**. D'autres sources de Ca^{2+} pourraient également être responsables de ces variations, comme des pompes ou des *buffering proteins* telles que la calmoduline, la neurogranine, la présiniline ou la septine **[56]**. Finalement, des observations suggèrent que ces mécanismes dépendent très certainement du type de neurones, de la région du cerveau ainsi que de la nature et de la localisation des récepteurs exprimés par les éléments neuronaux et astrocytaires **[57]**.

On retrouve parmi ces gliotransmetteurs le GABA, le glutamate, l'ATP ou encore la D-sérine. La D-sérine est d'un intérêt particulier dans le cerveau, étant un co-agoniste des récepteurs NMDA. Ces récepteurs sont des tétramères composés de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2[12] ou GluN3. Les sous-unités GluN2A et GluN2B sont respectivement localisées au niveau des récepteurs synaptiques et extra-synaptiques **[58]**. Dans l'hippocampe, la D-sérine serait le co-agoniste préférentiel des récepteurs NMDA synaptiques, alors que la glycine serait celui des récepteurs NMDA extra-synaptiques **[59]**, les GluN2A ayant vraisemblablement une plus grand affinité pour la D-sérine. En participant à l'ouverture des récepteurs NMDA, la D-sérine joue un rôle important dans la plasticité synaptique, puisque ces récepteurs sont essentiels pour la potentialisation à long-terme des synapses **[60]**.

L'origine cellulaire de la D-sérine est largement débattue **[61], [62]**. Les auteurs des deux précédentes études s'accordent sur l'origine astrocytaire de la L-sérine[13], mais Papouin *et al.* défendent l'hypothèse d'une racémisation et d'une libération astrocytaire, alors que Wolosker *et al.* clament que la L-sérine est transférée aux neurones, où elle est racémisée en D-sérine puis libérée. Les échanges de sérine entre neurones et astrocytes sont permis par différents transporteurs. Le transporteur ASCT1 (système de transport sodium-dépendant alanine-sérine-cystéine-thréonine-1) est le principal transporteur astrocytaire de sérine **[63]**. Le transporteur Asc-1 (système de transport sodium-indépendant alanine-sérine-cystéine-1) est exprimé par les neurones et il a été récemment montré qu'il joue un rôle important dans la régulation des concentrations extracellulaires de D-sérine dans le cerveau **[64], [65]**.

L'existence d'une navette sérine entre astrocytes et neurones, concernant sa biosynthèse, sa libération et sa dégradation est donc fortement probable, mais sa régulation reste à déterminer.

2.1.2. Le recyclage du glutamate

Les astrocytes expriment également à leur surface des transporteurs du glutamate GLAST (EAAT1) et GLT1 (EAAT2)[14]. Ces transporteurs permettent la recapture du glutamate après libération par les neurones. Cette recapture est essentielle à l'homéostasie cérébrale à plusieurs niveaux.

---

[11] Le réticulum endoplasmique est un réservoir intracellulaire d'ions Ca^{2+}.

[12] La sous-unité GluN2 étant largement exprimée dans l'hippocampe **[318]**.

[13] La L-sérine est le précurseur obligatoire de la D-sérine.

[14] Voir note 7 page 7.

Elle permet de limiter l'action du glutamate sur les récepteurs pré- et post-synaptiques et diminue ainsi les courants induits par les récepteurs NMDA et AMPA (acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique). Elle empêche également l'activation d'autres synapses excitatrices par débordement (*spillover*) du glutamate (par sa recapture, mais aussi par les astrocytes formant une barrière physique en englobant la synapse), permettant ainsi une modulation fine de la transmission synaptique [66].

De plus, si la transmission glutamatergique n'est pas régulée par cette recapture, elle peut s'avérer toxique pour les neurones via le phénomène d'excitotoxicité [67]. La suppression du gène EAAT2 chez la souris entraîne d'ailleurs des crises d'épilepsie [68].

Enfin, le glutamate récupéré par les astrocytes est transformé en glutamine par l'action de la glutamine synthase (GS)[15] (Figure I.8-5). La glutamine est ensuite transférée aux neurones où elle participe à la régénération du réservoir de glutamate, via l'action de la glutaminase, formant ainsi le cycle neuro-astrocytaire glutamate-glutamine.

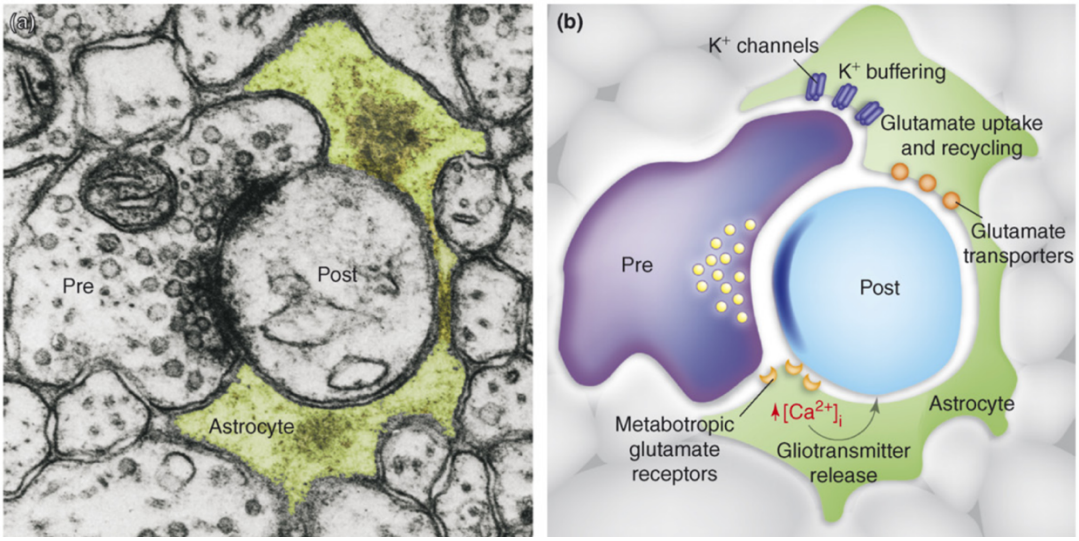


Figure I.8 – Les astrocytes se joignent aux neurones pour former les synapses tripartites et participer à l'activité synaptique [69]. **(a)** Synapse tripartite observée en microscopie électronique. **(b)** Schématisation de la synapse observée. Les prolongements astrocytaires sont en relation étroite avec les synapses. **(1)** ***K+ buffering*** **-** Les canaux potassiques récupèrent le potassium extracellulaire, libéré par les neurones lors de l'activité synaptique. **(2)** ***Metabotropic glutamate receptors*** **-** Les récepteurs du glutamate couplés aux protéines G sont sensibles à l'activité synaptique et entraînent un influx calcique déclenchant de nombreuses cascades de signalisation intracellulaires. **(3)** **$[Ca^{2+}]_i$ -** La signalisation calcique est certainement responsable de la libération de gliotransmetteurs. **(4)** ***Gliotransmitter release*** **-** La libération de gliotransmetteurs dans la fente synaptique peut moduler l'activité synaptique. **(5)** ***Glutamate transporters*** **-** Le glutamate est internalisé via des transporteurs, permettant ainsi son recyclage en glutamine et son retour dans les neurones.

[15] Cette enzyme est exclusivement astrocytaire.

2.1.3. L'HOMEOSTASIE POTASSIQUE

Les astrocytes possèdent un potentiel de repos relativement bas (pouvant descendre jusqu'à -85 mV) [70]. Cela est vraisemblablement dû au gradient de potassium ; en effet, une des premières fonctions des astrocytes décrites a été leur participation à l'homéostasie potassique. Lors de la transmission synaptique, la concentration en ions K^+ augmente largement aux abords de la synapse[16]. Les astrocytes possèdent à leur surface un nombre important de canaux potassiques spécialisés : Kir4.1 et la pompe Na^+/K^+-ATPase notamment (Figure I.8-1). Il a été décrit *in vitro*, qu'une élévation de la concentration en potassium dans le milieu de culture entraîne la recapture de ce potassium par les astrocytes et non les neurones [71]. L'inhibition des différents canaux a montré que Kir4.1 semble être spécialisé dans l'absorption du K^+ au moment de la transmission synaptique (pour compenser l'efflux dû aux PA), alors que la pompe Na^+/K^+-ATPase interviendrait dans la phase post-stimulus (pour compenser l'efflux de K^+ et l'influx de Na^+ dus aux transporteurs du glutamate) [72].

Les astrocytes sont donc centraux dans l'homéostasie cérébrale lors de la transmission synaptique, en contrôlant les niveaux extracellulaires de glutamate et de potassium. En recyclant le glutamate, les astrocytes régulent également le timing de l'activité synaptique ainsi que son étendue spatiale, en formant une barrière physique contre les débordements. Enfin, ils modulent l'information transmise en libérant des gliotransmetteurs lorsque des neurotransmetteurs se fixent à leurs récepteurs.

2.2. INTERACTIONS & SIGNALISATIONS METABOLIQUES : L'ECHANGE DE METABOLITES ISSUS DU GLUCOSE

En 1977, Sokoloff *et al.* ont développé la technique utilisant le [^{14}C]-2-désoxy-glucose (2-DG)[17] associé à l'autoradiographie pour mesurer de façon quantitative la consommation locale de glucose dans le cerveau [73]. Les années suivantes, de nombreux travaux ont montré grâce à cette technique que l'accumulation de 2-DG était étroitement corrélée de façon spatiale et temporelle à l'activité synaptique [74]. Dès lors, les équipes de recherche ont cherché à identifier les mécanismes responsables de ce couplage fonctionnel, appelé couplage neuro-métabolique. Il est maintenant admis que ce couplage repose sur des interactions étroites entre neurones, cellules gliales et cellules vasculaires. Rouach *et al.* ont montré en 2008 que ce couplage (1) repose sur l'activité des astrocytes organisés en réseaux grâce aux connexines et (2) implique les transporteurs au lactate (MCT, *mono-carboxylate transporters*, 1 et 4 pour les astrocytes, 2 pour les neurones), suggérant que la transformation de glucose en lactate est critique pour l'activité synaptique [75].

---

[16] Cette augmentation est principalement due à la génération des PA, mais également aux transporteurs du glutamate qui sont couplés à un influx de Na^+ et un efflux de K^+.

[17] Le 2-DG est un analogue du glucose. Il pénètre dans les cellules par les mêmes transporteurs que le glucose et subit la première étape de la glycolyse. Il est cependant bloqué après celle-ci, ne pouvant pas être pris en charge par la phosphoglucoisomérase, deuxième enzyme de la voie.

Dès la découverte du lactate en 1780, cette molécule a été perçue comme toxique pour le corps. En effet, les études du métabolisme ont été majoritairement réalisées sur des muscles, où le lactate est responsable de l'acidose musculaire. Ce n'est qu'à partir des années 1980 que des études ont permis de changer ce concept et de conclure que le lactate pouvait être considéré comme une molécule énergétique importante [76]. Pellerin et Magistretti ont proposé en 1994 le modèle *astrocyte-neuronal lactate shuttle* (ANLS) [77] pour répondre aux besoins énergétiques des neurones durant l'activité synaptique. Cette étude, réalisée avant l'obtention des données transcriptomiques ayant établi les profils métaboliques des neurones (voir section 1.3.1) et des astrocytes (voir section 1.3.2) a été l'objet d'une intense controverse [78]–[81]

Le développement des sondes FRET[18] (*Förster/fluorescense resonance energy transfer*) sensibles au lactate (*laconic*) a permis de mettre en évidence l'existence d'un gradient de lactate des astrocytes vers les neurones, en conditions physiologiques *in vivo* [82]. L'étude du métabolisme du lactate *in vivo* est néanmoins très compliquée, puisque les techniques actuelles ne permettent pas d'identifier l'origine cellulaire du lactate, faute de résolutions spatiale et temporelle suffisante, ni de le quantifier. L'équipe de Julien Valette au laboratoire tente de mettre au point l'imagerie non invasive du lactate par spectroscopie par résonance magnétique pondérée par diffusion (*diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy*) à l'échelle cellulaire. Leurs premiers résultats corroborent l'idée d'un gradient de lactate des astrocytes vers les neurones en conditions physiologiques, mais met également en avant un remodelage du métabolisme du lactate en conditions pathologiques[19], où ce-dernier deviendrait principalement neuronal [83].

Ainsi, la production de lactate par les astrocytes et son échange avec les neurones en conditions physiologiques sont soutenus par de nombreuses évidences expérimentales même s'il n'a pas été encore possible de le suivre et de l'observer en temps réel [84].

Le lactate agit sur une myriade de fonctions cérébrales (Figure I.9) succinctement détaillées ici et dont la mécanistique est encore peu connue. Les revues de Barros [85] et Magistretti & Allaman [86] en présentent une liste complète.

[18] Voir Chapitre V annexe 1 pour une description du fonctionnement des sondes FRET.

[19] Sous-entendu, lorsque les astrocytes sont réactifs.

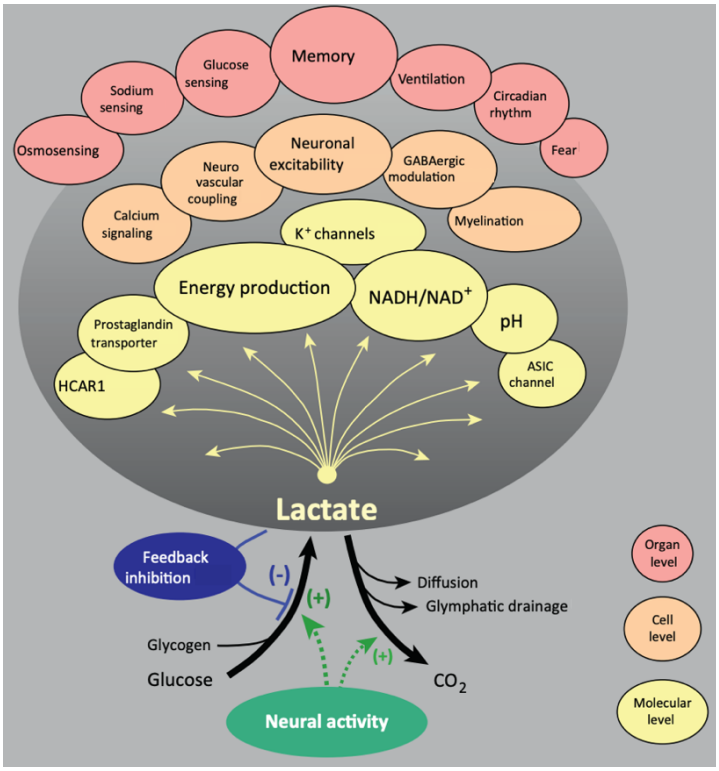


Figure I.9 – Modulation des fonctions cérébrales par le lactate, adaptée de [85]. Les concentrations extracellulaires de lactate dépendent à la fois de la production glycolytique astrocytaire et de la consommation mitochondriale des neurones, toutes deux sous contrôle de l'activité synaptique. Le lactate est utilisé comme support énergétique mais module également l'activité d'une myriade de cibles moléculaires. Le lien mécanistique entre les cibles moléculaires du lactate et les fonctions cérébrales impactées sont un pan important de la recherche actuelle.

Il n'est plus à prouver que l'activité physique joue un rôle sur la cognition et la mémoire en repoussant le vieillissement du cerveau [87], la neuro-dégénération [88] et en stimulant la neurogenèse [89], [90]. Mais l'activité physique engendre également une élévation du taux de lactate sanguin qui peut très certainement prendre part à ces mécanismes [91]. En effet, Suzuki *et al.* [92] ainsi que Newman *et al.* [93] ont montré en 2011, que l'inhibition pharmacologique de la production ou des transporteurs astrocytaires du lactate résulte en une altération de la mémoire et de la LTP (potentialisation à long-terme) dans l'hippocampe. La supplémentation en lactate, mais pas en glucose, est capable de restaurer ces déficits, suggérant ainsi que la libération de lactate par les astrocytes serait indépendante de son rôle énergétique. Depuis 2011, plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes sous-tendant le rôle du lactate dans les processus de mémorisation et de plasticité. Les récepteurs β2-adrénergiques, exprimés par les astrocytes de l'hippocampe, seraient nécessaires pour la libération de lactate [94], via un canal potassique à haute-capacité, permettant ainsi une signalisation localement spécifique [95]. Le lactate déclencherait dans les neurones des cascades de signalisation en activant les récepteurs neuronaux couplés aux protéines G, HCAR1 (*hydrocarboxylic acid receptor 1*) [96]. Finalement, le lactate stimulerait l'expression d'une vingtaine de gènes liés à la plasticité synaptique, à travers des mécanismes redox et la potentialisation des récepteurs NMDA [97], [98].

L'étude des fonctions non métaboliques du lactate a également mis en avant son rôle dans les modifications épigénétiques. La lactylation des histones, sur les résidus lysine représente une marque activatrice de la transcription chromatinienne [99].

Enfin, le lactate serait neuro-protecteur dans le cadre des ischémies et des crises d'épilepsie, contextes dans lesquels les concentrations locales extracellulaires de lactate augmentent drastiquement [100]. Récemment, il a été montré que l'administration de

lactate dans un modèle d'ischémie hypoxique néonatale de rat restaure les capacités cognitives et diminue le volume des lésions cérébrales [101].

Des études supplémentaires sont nécessaires pour entièrement comprendre le rôle et les voies de signalisation via lesquelles le lactate participe à la plasticité synaptique, l'épigénétique et aux différentes pathologies du cerveau. Ces différentes découvertes ont néanmoins grandement élargi le spectre des rôles du lactate dans le cerveau, en dehors du métabolisme énergétique.

Le lactate est loin d'être la seule molécule de signalisation astrocytaire issue du glucose. La L-sérine joue également des rôles prépondérants au niveau de la neurotransmission et la mémoire, de l'homéostasie redox, de la morphologie cellulaire et de l'épigénétique. La section 4 de l'introduction lui sera entièrement dédiée.

En conclusion, les astrocytes participent activement à l'activité synaptique via la production de nombreuses molécules. Le fait que ces mécanismes consomment beaucoup d'énergie, couplé aux faibles réserves énergétiques du cerveau, suggèrent que des altérations du métabolisme puissent avoir des conséquences dramatiques sur la physiologie du cerveau. C'est pourquoi l'activité métabolique est étudiée dans de nombreuses pathologies du cerveau, et notamment la maladie d'Alzheimer, où un hypo-métabolisme du glucose pourrait être responsable de certains symptômes.

3. La maladie d'Alzheimer

La démence est un trouble cognitif chronique et évolutif entraînant une altération de la fonction cognitive plus importante que celle que l'on pourrait attendre du vieillissement normal. Elle affecte principalement la mémoire, l'apprentissage, le raisonnement, l'orientation, la compréhension et le jugement, sans pour autant toucher à la conscience. Dans le monde, la démence concerne 50 millions de personnes. Elle est causée par un ensemble de maladies et traumatismes affectant le cerveau, comme l'accident vasculaire cérébral, ou la maladie d'Alzheimer. Cette dernière est d'ailleurs la première cause de démence au monde, étant responsable de 60 à 70% des cas [102].

En France, on compte, en fonction des sources, entre 900 000 et 1.3 million de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [103]–[105]. Les estimations s'attendent à ce que ce chiffre augmente jusqu'à 2.1 millions de patients d'ici les années 2040 [103], ce qui en fait une priorité de santé publique. Elle touche entre 2 et 4% des personnes âgées de plus de 65 ans, et jusqu'à 15% de la population âgée de plus de 80 ans. Les femmes sont plus touchées que les hommes, puisqu'elles représentent 60% des cas.

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois en 1907 par Alois Alzheimer, après l'analyse anatomopathologique du cerveau d'une patiente de 51 ans. Il y décrit notamment une atrophie cérébrale, l'apparition de fibrilles intra-neuronaux épais et sujets à coloration[20], la disparition de nombreux neurones[21], le dépôt d'une « substance spéciale » dans le cortex, et une forte réactivité gliale « *The glia has developped numerous fibers* » [106], [107]. En 1912, le psychiatre Emil Kraepelin, collaborateur d'Alzheimer, publie son Traité de psychiatrie, dans lequel il nomme la maladie décrite par A. Alzheimer, maladie d'Alzheimer. Les mécanismes sous-tendant cette maladie, bien qu'elle fut décrite il y a plus de 100 ans et largement étudiée[22], sont si complexes qu'aucun traitement efficace n'est actuellement disponible.

3.1. Caracterisation generale de la maladie d'Alzheimer

La grande majorité des cas de la maladie d'Alzheimer est d'origine **sporadique** (95-99%) et apparaît après l'âge de 60 ans. De nombreux facteurs de risques ont été identifiés, comme des facteurs génétiques (*APOEε4, TREM2*, voir section 3.1.2), des facteurs de comorbidité (maladies cardiovasculaires, maladies vasculaires cérébrales, diabète, dépression [108], …), ou encore des facteurs environnementaux (aluminium [109], alimentation riche, peu d'activité physique, …). Le principal facteur de risque étant l'âge.

Les 1-5% des cas restants sont d'origine **familiale** et dus à des mutations dans les gènes *APP* (*amyloid precursor protein*), *PSEN1* et *PSEN2* (*presinilin*), devenant alors responsables de la production des peptides Aβ (amyloïde bêta). Ces formes héréditaires apparaissent précocement, avant l'âge de 60 ans [110]. L'identification de ces gènes a permis la génération des premiers modèles animaux, accélérant ainsi l'étude de cette maladie. Que la forme soit sporadique ou familiale, elle induit des symptômes similaires.

[20] Alors que les « neurofibrilles » normaux ne sont pas censés s'imprégner des colorations utilisées.
[21] Dont il ne reste que les fibrilles pour attester de leur ancienne présence.
[22] 157 480 résultats PubMed pour la recherche *« "alzheimer"[All Fields] OR "alzheimer disease"[All Fields] OR "alzheimer's disease"[All Fields]* » en mai 2020.

Les études anatomopathologiques post-mortem d'A. Alzheimer ont révélé trois types de lésions : l'atrophie cérébrale, les plaques séniles (ou dépôts amyloïdes ou plaques Aβ) et les dégénérescences neurofibrillaires (Figure I.10).

3.1.1. CARACTERISATION ANATOMOPATHOLOGIQUE

L'atrophie est due à la perte des synapses et à la mort des neurones dans certaines régions du cerveau (Figure I.10-B). Elle débute dans le cortex entorhinal, l'amygdale et l'hippocampe **[111]** (lobes temporaux), avant de se propager au lobe pariétal, puis au lobe frontal **[112]**. L'hippocampe est une région touchée très tôt par cette atrophie (voir section 3.2).

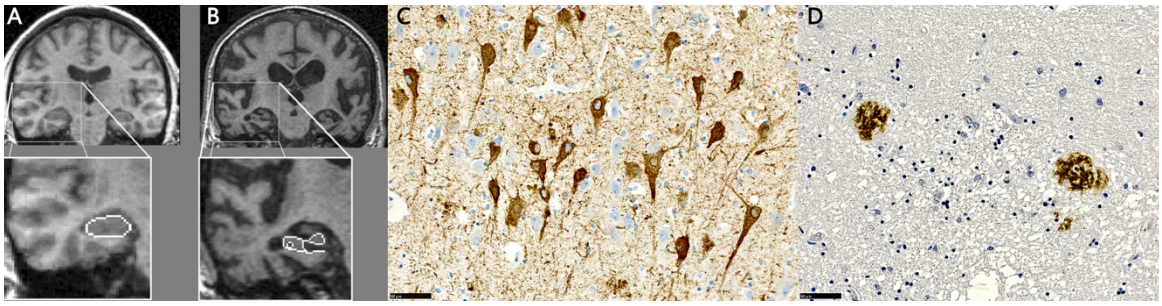


Figure I.10 – Anatomopathologie de la maladie d'Alzheimer. Cerveaux humains visualisés par IRM et histologie post-mortem. A & B - IRM d'un sujet sain (**A**) et d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (**B**), adaptée de **[113]**. **Cerclé de blanc -** Hippocampe. L'hippocampe, comme le reste du cerveau, présente une atrophie chez le sujet malade. **C -** Marquage de la protéine Tau (**marron**), montrant son accumulation dans les neurones et signifiant la présente de dégénérescences neurofibrillaires. **D -** Marquage des plaques séniles (**marron**), résultant du dépôt extracellulaire de la protéine Aβ. Barre d'échelle=50 µm. Les images **C** et **D** proviennent de marquages effectués au laboratoire.

Les dégénérescences neurofibrillaires (**pathologie tau**) sont dues à la rupture d'interaction de la protéine Tau avec les microtubules et à son agrégation. Tau est une protéine soluble neuronale **[114]**, exprimée majoritairement dans les axones, qui permet à la fois la stabilisation des microtubules, en promouvant l'assemblage de la tubuline, ainsi que la régulation du transport axonal **[115]**. Dans la maladie d'Alzheimer, le niveau de phosphorylation de Tau augmente (Figure I.11, phosphorylation sur des sites pathologiques, hyper-phosphorylation sur des sites physiologiques), ayant pour double effet de diminuer son affinité pour les microtubules **[116], [117]** et de lui conférer une conformation en feuillets β **[118]**. Cette nouvelle conformation engendre son agrégation en oligomères filamenteux puis la formation de dégénérescences neurofibrillaires s'accumulant dans les neurones (Figure I.10-C) ainsi que la perturbation du transport axonal **[119]**. L'agrégation de Tau débute dans le cortex entorhinal puis l'hippocampe et les cortex qui lui sont reliés, avant de toucher tout le cerveau **[120]**.

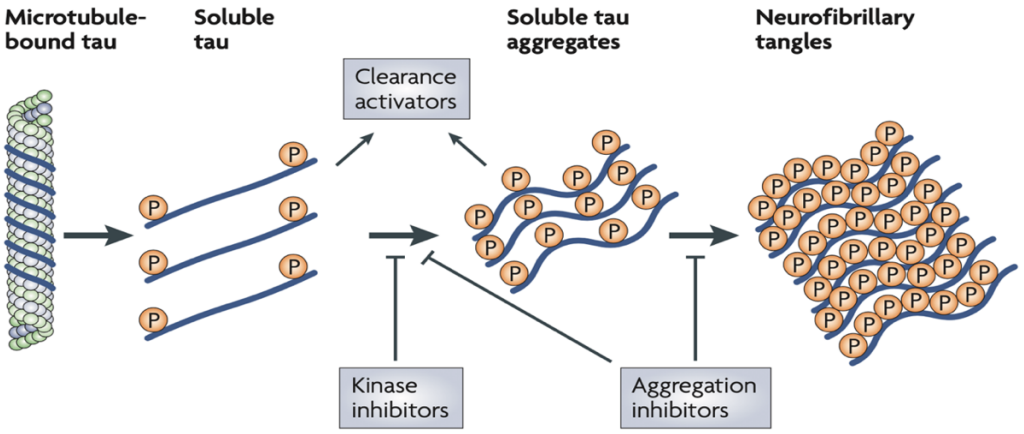


Figure I.11 – Mécanisme d'agréation de la protéine Tau et cibles thérapeutiques envisagées, adaptée de [121]. La protéine Tau est associée aux microtubules pour favoriser leur stabilisation. Son hyper-phosphorylation empêche ces interactions et conduit à son agrégation jusqu'à la formation de dégénérescences neurofibrillaires.

Les plaques séniles (**pathologie amyloïde**) résultent du dépôt extracellulaire du peptide anormal Aβ. Ce peptide dérive de la protéolyse de la protéine transmembranaire APP. En conditions physiologiques, l'APP est clivée par une α-sécrétase puis une γ-sécrétase (Figure I.12-voie non amyloïdogénique). Si au contraire, le premier clivage est réalisé par une β-sécrétase, cela conduit à la génération des peptides Aβ (Figure I.12-voie amyloïdogénique). Les monomères d'Aβ sont solubles mais subissent un changement conformationnel spontané en feuillets β, déclenchant leur agrégation en fibrilles, qui à leur tour s'agrègent en plaques. Les plaques Aβ se déposent très tôt dans le décours de la maladie et touchent d'abord le néocortex avant de s'étendre aux autres régions du cerveau. Ces plaques altèrent la trajectoire des axones et des dendrites et perturbent les synapses environnantes [120].

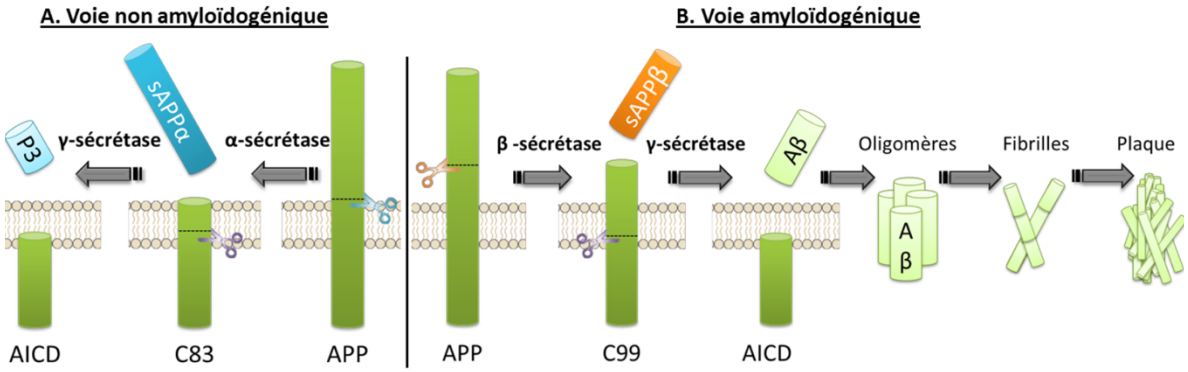


Figure I.12 – Protéolyses physiologique et pathologique de l'APP, adaptée de [122]. **A -** L'APP est clivée par l'α-sécrétase libérant deux fragments : C83 et sAPPα, ce-dernier ayant des propriétés neurotrophiques. Le fragment C83 est ensuite clivé par la γ-sécrétase libérant les fragments AICD et P3. **B -** L'APP est anormalement clivée par la β-sécrétase libérant un fragment C99 et sAPPβ. Le fragment C99 est clivé également par la γ-sécrétase produisant le fragment AICD et un fragment pathologique Aβ composé de 39 à 43 acides aminés. L'Aβ soluble peut ensuite s'agréger en oligomères, fibrilles puis plaques amyloïdes.

En plus de ces lésions cérébrales, A. Alzheimer a également décrit des changements morphologiques au regard des cellules gliales. Ces modifications concernent principalement les **astrocytes** et les **microglies**, capables de devenir réactifs, bien que les **oligodendrocytes** puissent également jouer un rôle dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer.

La réactivité **astrocytaire** s'accompagne de nombreuses modifications cellulaires et moléculaires, conférant aux astrocytes de nouvelles fonctions au détriment de certaines. La caractéristique principale de cette réactivité est l'augmentation de l'expression des protéines constituant les filaments intermédiaires (la GFAP, *glial fibrillary acid protein* et la vimentine), leur conférant ainsi une morphologie hypertrophique **[123]** (Figure I.13-D & E). Les astrocytes forment une population largement hétérogène, dont leurs fonctions dépendent des régions, des circuits neuronaux et de voies de signalisation qu'ils expriment **[124]**. L'acquisition d'un profil réactif n'aurait pas les mêmes conséquences en fonction du type d'astrocyte. Il a été décrit l'existence de deux types distincts, les astrocytes A1, qui seraient neurotoxiques, et les A2, neuro-protecteurs[23] **[125], [126]**. Ces deux types semblent être des extrêmes phénotypiques et ne représentent qu'une catégorisation simpliste de ces cellules. Ces changements de morphologie et de profil métabolique engendrent de nombreuses perturbations au niveau de la signalisation calcique, des processus inflammatoires, des voies de signalisation et de la gliotransmission. Par exemple, il a été montré dans plusieurs modèles murins de la maladie d'Alzheimer, que les astrocytes réactifs libèrent des quantités aberrantes de GABA dans la fente synaptique, détériorant grandement la mémoire de ces souris **[127]**.

Étant donné le rôle primordial des astrocytes dans l'homéostasie cérébrale et la transmission synaptique (voir section 2), l'acquisition d'un profil réactif dans la maladie d'Alzheimer soulève plusieurs questions cruciales : ces changements drastiques sont-ils bénéfiques ? Délétères ? Les deux à la fois ? Répondre à ces questions est primordial pour comprendre les mécanismes sous-tendant la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Au laboratoire, Ceyzériat *et al.* ont montré en 2018 que l'inhibition de la réactivité astrocytaire, par thérapie génique ciblant la voie JAK2-STAT3 est bénéfique dans deux modèles murins de la maladie d'Alzheimer (APP/PS1ΔE9 et 3xTg-AD) **[128]**.

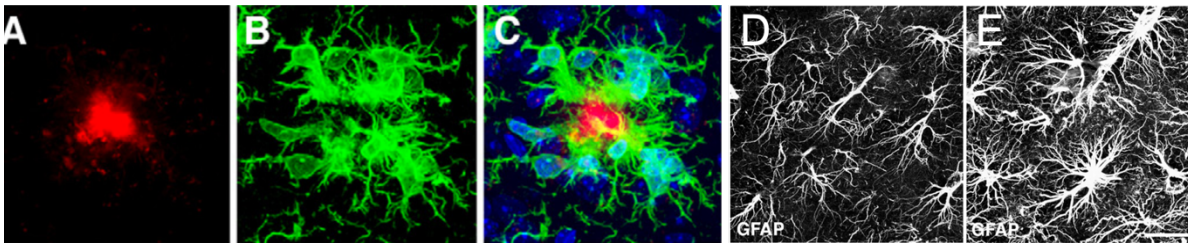


Figure I.13 – Morphologie des cellules gliales dans la maladie d'Alzheimer, adaptée de [129], [130]. **A -** Plaque amyloïde marquée par l'anticorps 4G8 (**rouge**). **B -** Microglies marquées par l'anticorps Iba1 (**vert**). **C -** Superposition de A et B. Contremarquage nucléaire TO-PRO-3 (**bleu**). Les microglies entourent la plaque amyloïde. **D & E -** Astrocytes marqués par l'anticorps GFAP. La réactivité astrocytaire (**E**) augmente l'expression de la GFAP et confère une forme hypertrophique aux astrocytes.

[23] La réactivité augmenterait chez les A1 l'expression de gènes de la voie du complément et néfastes pour les synapses. Chez les A2, la réactivité augmenterait l'expression de facteurs neuro-trophiques.

Les **microglies** sont les cellules immunitaires du CNS. Fortement dynamiques, elles sont capables de migrer dans le parenchyme cérébral et de le scanner. Elles participent à la construction des réseaux neuronaux en phagocytant les synapses inutilisées durant le développement. Il en va du même processus dans la plasticité de ces réseaux, où les microglies participent à leur remodelage. Un excès de phagocytose de la part de ces cellules pourrait expliquer les altérations des réseaux neuronaux observées dans la maladie d'Alzheimer, puisque la perte de synapses corrèle avec le déclin cognitif. En effet, dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, il semblerait que les mécanismes d'élagage synaptique par les cellules microgliales, dépendants de la voie du complément et normalement actifs durant le développement, soient activés de façon inappropriée à l'âge adulte **[131]**. Les microglies sont également capables de réactivité, diminuant leurs capacités migratoires et augmentant leurs capacités de phagocytose. Comme pour les astrocytes, la réactivité entraîne des changements morphologiques, moléculaires et de fonctions. L'acquisition d'un profil réactif peut engendrer deux types de microglies, les M1 pro-inflammatoires, neurotoxiques et M2, anti-inflammatoires et neuro-protectrices **[132]**. Cette classification est néanmoins largement débattue (voir **[133]** pour une discussion détaillée). Une nouvelle classification, basée sur leur profil d'expression génétique, a été proposée en 2017 pour étayer cette première. Les DAM (*disease-associated microglia*), non détaillées ici, sont retrouvées dans des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de la sclérose latérale amyotrophique **[134]**.

Dans la maladie d'Alzheimer, les dépôts amyloïdes seraient phagocytés par les microglies **[135]**, déclenchant ainsi leur réactivité vers un profil M1 (Figure I.13-A-C), et participant à la propagation de l'inflammation dans le cerveau via la libération de cytokines et molécules du complément. De plus, les microglies libèreraient des fragments mitochondriaux, capables d'activer les astrocytes vers un profil neurotoxique A1, participant à leur tour à la neuro-dégénération **[136]**. Enfin, de nombreux facteurs de risque génétiques de la maladie d'Alzheimer concernent des gènes exprimés par la microglie, en lien avec la neuro-inflammation (voir section 3.1.2), suggérant un rôle prépondérant des microglies dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Les recherches sur la microglie sont en expansion et de nombreuses nouvelles fonctions ont été récemment découvertes **[137]**. Comprendre la physiologie de ces cellules et la façon dont elles réagissent face aux lésions cérébrales est primordial afin d'appréhender leurs rôles dans les maladies neurodégénératives.

Les **oligodendrocytes**, quant à eux, ne sont à priori pas capables de réactivité. Ils produisent la myéline qui enrobe les neurones dans le CNS et participent au support métabolique (notamment via l'échange de lactate) et trophique des axones **[12]**. Ils sont perçus comme des cellules extrêmement vulnérables et leur nombre décroît largement au cours du vieillissement. Dans la maladie d'Alzheimer, il semblerait que l'Aβ puisse altérer la production de myéline **[138]**, et ce de façon précoce **[139]**. La démyélinisation a des conséquences dramatiques sur la transmission synaptique, suggérant qu'une altération des fonctions oligodendrocytaires puisse participer à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

Jusqu'à récemment, la recherche sur les maladies neurodégénératives est restée très centrée sur les neurones. L'expansion de l'étude du rôle joué par les cellules gliales dans ces pathologies cérébrales est nécessaire afin de mieux comprendre quels sont les

changements subis par ces cellules, comment ceux-ci participent à l'établissement et à la propagation de la maladie pour potentiellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

3.1.2. Les predispositions genetiques associees a la maladie d'Alzheimer

Les études pan-génomiques GWAS (*genome-wide association studies*) ont permis de révéler plus de 20 loci génétiques associés au risque de développer la maladie d'Alzheimer. Ces gènes sont en lien principalement avec le métabolisme du cholestérol, le système immunitaire et la réponse inflammatoire, ainsi que l'endocytose (Figure I.14) (consulter **[140]** pour plus de détails et les références associées). En relation avec les formes familiales et les mutations du métabolisme de l'APP, les études GWAS ont identifié un variant du gène *ADAM10* impliqué dans le développement d'une forme sporadique de la maladie d'Alzheimer. Ce gène code normalement pour une α-sécrétase promouvant la voie non amyloïdogénique du clivage de l'APP.

Le facteur de risque le plus associé au développement de la maladie d'Alzheimer est le variant ε4 du gène de l'apolipoprotéine E (*APOE*) **[141]**. Les porteurs ont 3 à 15 fois plus de risque de développer la maladie selon qu'ils aient 1 ou 2 allèles mutés (Figure I.14). APOE joue un rôle dans le transport du cholestérol, la plasticité cérébrale et l'inflammation, expliquant ainsi son implication dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. De plus, l'isoforme ε4 interfère avec la clairance de l'Aβ et peut être clivé en fragments neurotoxiques **[142]**. D'autres mutations dans des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol sont également associées au développement de la maladie d'Alzheimer, dans une moindre mesure (Figure I.14). C'est par exemple le cas de *CLU*, codant pour une apolipoprotéine sécrétée, impliquée à la fois dans les métabolismes de l'APP et des lipides ou ABCA7, un transporteur jouant un rôle peu connu dans l'homéostasie lipidique **[143], [144]**.

Concernant la réponse immunitaire et l'inflammation, un gène largement étudié est *TREM2* (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) **[145]**, codant pour un récepteur membranaire exprimé dans la microglie. Son variant R47H confère la même vulnérabilité à la maladie d'Alzheimer qu'une hétérozygotie pour ApoEε4 (Figure I.14). TREM2 stimule la phagocytose et inhibe l'inflammation, son variant semblerait diminuer la clairance du peptide Aβ. Largement étudié, les résultats sur son rôle dans la maladie d'Alzheimer sont débattus. Néanmoins une des observations validée est la diminution du nombre de microglies entourant les plaques séniles chez des patients porteurs du variant ou des souris déficientes en TREM2 (voir **[146]** pour une revue détaillée du rôle de TREM2 dans la maladie d'Alzheimer). D'autres variants de gènes associés à la réponse immunitaire et aux microglies, comme *CR1* (protéine du complément) ou *CD33* (récepteur présent à la surface des microglies et modulant leur réactivité) représentent un facteur de risque moindre **[143], [144]**, au même titre que *CLU* et *ABCA7* (Figure I.14). La récurrence de gènes du système immunitaire et de l'inflammation dans les risques liés au développement de la maladie d'Alzheimer suggère une fois de plus un rôle prépondérant des microglies dans la pathogenèse de cette maladie.

D'autres gènes sont concernés, mais présentent une prévalence dans la population un peu moins élevée. Ils sont résumés en Figure I.14 et plus de détails peuvent être trouvés dans **[147]**.

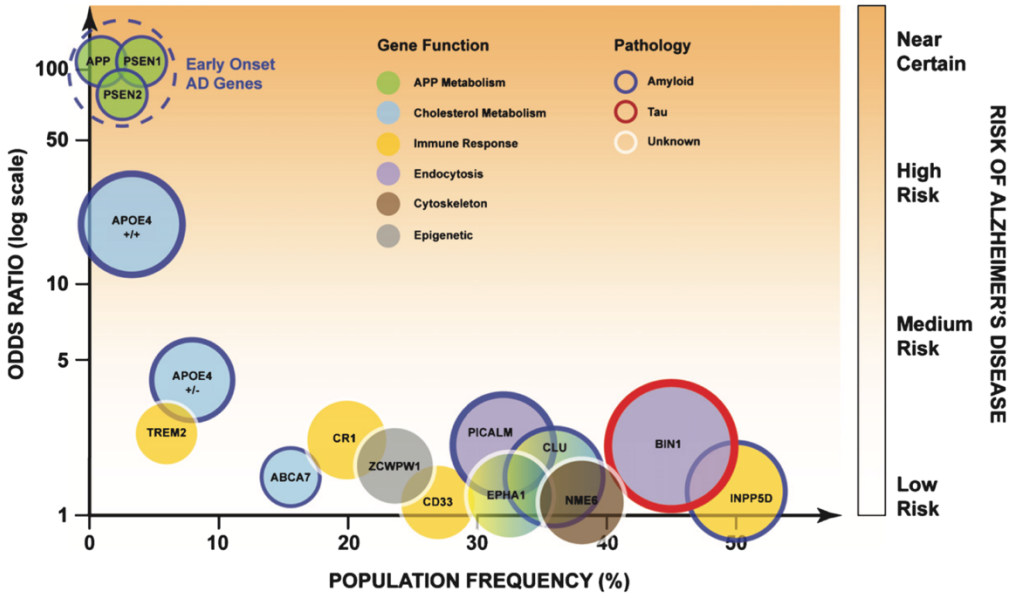


Figure I.14 – Résumé des facteurs de risque génétiques liés au développement de la maladie d'Alzheimer, [147]. APP, PSEN1 et PSEN2 sont des gènes entraînant une forme familiale de la maladie. Les gènes à haut risque sont associés à une plus grande sévérité de la maladie. L'aire des cercles est proportionnelle à la fraction de la population possédant ce gène muté et développant la maladie d'Alzheimer.

3.1.3. TRAITEMENTS ET ESSAIS CLINIQUES

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif pour la maladie d'Alzheimer. De nombreux essais cliniques ont vu le jour, mais sont souvent stoppés en cours de route car les molécules n'améliorent pas, et même aggravent, la cognition des patients. Les traitements disponibles (Donépézil, Galantamine, Rivastigmine et Mémantine, …) sont palliatifs et peuvent entraîner des effets secondaires importants, allant de la fatigue aux hépatites, en passant par des troubles digestifs voire l'anorexie. Les trois premiers diminuent l'activité de l'acétylcholinestérase, afin de remédier à la diminution précoce des neurones cholinergiques. La Mémantine est, quant à elle, un antagoniste des récepteurs NMDA, visant à empêcher leur sur-activation et donc une éventuelle excitotoxicité. Malheureusement, tous ces traitements n'améliorent les symptômes que modérément, et seulement pour un temps limité [148].

Les nouvelles stratégies en cours de développement sont nombreuses à se concentrer sur l'immunothérapie, cherchant à utiliser des anticorps contre les peptides Aβ ou la protéine Tau afin d'empêcher leur agrégation. Des médicaments comme l'Aducanumab, le Gantenerumab ou le Donanemab avancent dans les essais cliniques et sont prometteurs, dans le sens où la charge amyloïde diminue sous le seuil de positivité chez les patients les ayant reçus. L'amélioration de la cognition chez les patients ayant reçu l'Aducanumab est néanmoins controversée. Concernant le Gantenerumab et le Donanemab, le recul n'est pas encore suffisant pour se prononcer sur leurs effets sur la cognition. Les premiers résultats concernant une immunothérapie dirigée contre la protéine Tau sont tombés en 2019 et ne sont malheureusement pas prometteurs.

Des inhibiteurs des BACE (gènes codant pour la β-sécrétase), comme le Verubecestat, l'Umibecestat ou l'Elenbecestat sont également testés en essais cliniques, mais n'ont fait qu'empirer les troubles cognitifs des patients. Néanmoins, le choix a été fait de les tester à plus faible dose et de façon préventive plutôt que curative.

De nombreuses autres stratégies sont envisagées et porteuses d'espoir. Notamment avec l'Apabétalone, un médicament forçant un remodelage épigénétique et semblant diminuer la neuro-inflammation ou la technique AMBAR (*Alzheimer's management by albumin replacement*), visant à dialyser le sang et le purger des peptides amyloïdes qu'il contient.

Toutes les informations concernant les espoirs et les échecs de ces essais cliniques sont détaillées et référencées dans un article disponible sur **Alzforum**, *2019–A Year of Hope for Alzheimer's Research* **[149]**.

Malgré ces avancées, il semble peu probable qu'un traitement curatif puisse voir le jour tant que nous ne connaîtrons pas les causes de la maladie d'Alzheimer, pour pouvoir tenter de les contrer directement. Un autre challenge actuel de la recherche est de réussir à diagnostiquer suffisamment tôt la maladie pour pouvoir la prendre en charge le plus rapidement possible. Le plus tôt un traitement pourra être administré, le plus il sera efficace. A défaut d'administrer un traitement, diagnostiquer de façon précoce permettrait de mettre en place des mesures préventives des facteurs de risque pour repousser le plus tard possible l'apparition des premiers symptômes. Pour ce faire, les techniques d'imagerie cérébrale et l'identification de biomarqueurs se développent, afin d'essayer de percevoir les signes avant-coureurs de la maladie d'Alzheimer. Selon les dernières études, l'imagerie TEP de Tau semble être plus prometteuse que celle visant l'Aβ **[150]**.

3.2. L'HYPO-METABOLISME DU GLUCOSE, UN SIGNE PRECOCE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Les études longitudinales réalisées sur des cohortes de personnes porteuses des mutations responsables des formes familiales de la maladie d'Alzheimer ont permis d'identifier certains facteurs pré-symptomatiques, bien avant l'apparition des premiers troubles cognitifs (Figure I.15). Les patients présentent ainsi une atrophie de l'hippocampe, des perturbations au niveau du métabolisme et de l'activité cérébrale lors de tâches mémorielles (mesurées par la méthode CDR-SOB, *clinical dementia rating-sum of boxes*) et des dépôts amyloïdes. Les premiers changements ont lieu une vingtaine d'années avant l'apparition des symptômes. Il s'agit d'abord de l'apparition des premiers dépôts amyloïdes coïncidant avec la diminution des niveaux d'$A\beta_{42}$[24] dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), suivi de la diminution du métabolisme du glucose et de l'augmentation de la concentration en protéine Tau dans le LCR **[151]**.

[24] Le peptide Aβ peut être composé de 39 à 43 acides aminés, en fonction du clivage de l'APP.

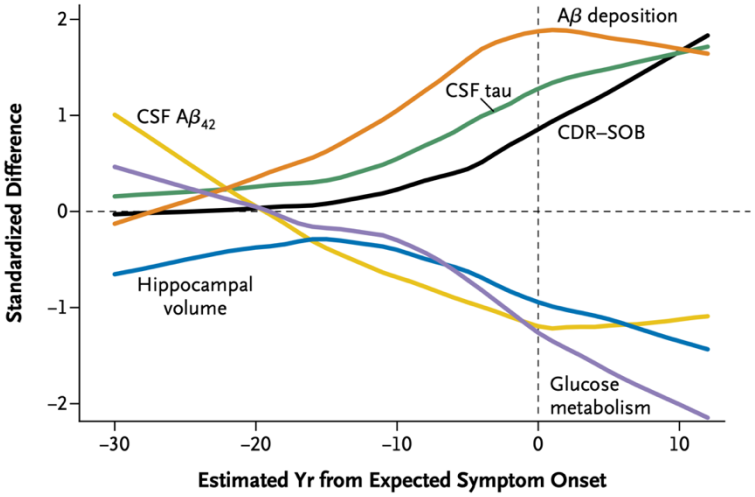


Figure I.15 – Comparaison des changements cliniques, cognitifs, structuraux, métaboliques et biochimiques en fonction du temps estimé avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie d'Alzheimer, [151]. Les courbes représentent la différence normalisée entre porteurs et non porteurs des mutations. L'ordre suggéré des changements est 1. Diminution de l'$A\beta_{42}$ dans le LCR (**CSF $A\beta_{42}$**), 2. Dépôts amyloïdes (**Aβ deposition**), 3. Augmentation de Tau dans le LCR (**CSF tau**), 4. Atrophie de l'hippocampe (**hippocampal volume**), 5. Hypo-métabolisme du glucose (**glucose metabolism**), 6. Apparition des premiers troubles cognitifs et cliniques (mesurés par la méthode **CDR-SOB**).

Ces résultats ont été confirmés par Gordon *et al.* en 2018 **[152]**. En combinant différentes techniques d'imagerie du cerveau (TEP, tomographie par émission de positons, avec différents isotopes radioactifs et IRM), ils ont suivi durant 7 ans les changements survenant dans le cerveau de porteurs des mutations engendrant une forme familiale de la maladie d'Alzheimer. Ils ont montré que les dépôts amyloïdes surviennent 18 ans avant la date estimée d'apparition des symptômes, suivi 4 à 6 ans après par l'altération du métabolisme du glucose.

L'activité synaptique requiert une quantité importante d'énergie (section 1.2). La diminution du métabolisme du glucose, avant l'apparition des symptômes, dans la maladie d'Alzheimer, suggère qu'elle puisse prendre une part prépondérante dans sa genèse, en participant à la perturbation de la communication neuronale. En effet, le métabolisme du glucose est largement diminué chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (-20 à -25%), comparé à des sujets sains de même âge **[153], [154]**. Une région particulièrement touchée est l'hippocampe, essentielle pour la formation de la mémoire et une des premières à être touchée par la pathologie Tau (voir section 3.1.1). Bien que l'hippocampe soit touché par une atrophie (voir section 3.1.1) rendant particulièrement compliquée la quantification de la diminution du métabolisme du glucose, l'imagerie TEP a permis de mettre en avant ces déficits, par diminution de l'accumulation du ^{18}[F]-fluoro-désoxy-glucose (FDG)[25] (Figure I.16). Cet hypo-métabolisme du glucose a été confirmé par analyse protéomique, montrant une diminution de l'expression des enzymes de la glycolyse chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, à différents stades **[155]**.

[25] Le FDG correspond au 2-DG portant un isotope radioactif du Fluor. Il pénètre dans les cellules de la même façon que le 2-DG. Son isotope radioactif restant lié, sa présence est détectable par imagerie TEP.

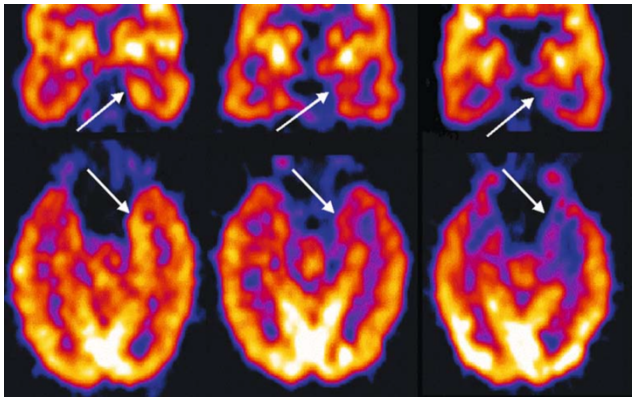


Figure I.16 – Hypo-métabolisme du glucose dans l'hippocampe [113]. En **haut**, coupe frontale. En **bas**, coupe transversale. A **gauche**, patient sain. Au **milieu**, patient atteint de déficience cognitive légère. A **droite**, patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Les **flèches blanches** pointent l'hippocampe gauche. La coloration étalonnée de **bleu à blanc** signifie une consommation de glucose de faible à forte. L'hypo-métabolisme du glucose est plus présent chez les deux patients de droite.

Les mécanismes à l'origine de cette diminution du métabolisme du glucose ne sont pas connus. Les études *in vitro* de co-culture de neurones et d'astrocytes, dérivés de cellules souches humaines ont néanmoins permis de pointer le rôle de l'Aβ. L'ajout d'oligomères d'Aβ dans le milieu de culture perturbe fortement le métabolisme du glucose dans les deux types cellulaires. En effet, cela engendre une diminution de la consommation de glucose, l'accumulation intra-cytoplasmique de glucose, glucose-6-phosphate et glycogène, une augmentation de la production de pyruvate, accompagnée d'une diminution de la production de lactate, de glutamate, d'ATP et de $NADH,H^+$ [156]. Cette observation semble cependant faire partie d'un cercle vicieux [157]. En effet, *in vitro*, la perturbation du métabolisme astrocytaire du glucose par inhibition de PFKFB3, entraîne une accumulation de l'Aβ plus importante à laquelle les astrocytes deviennent particulièrement sensibles[26] [158].

L'hypo-métabolisme du glucose est donc un signe pré-clinique de la maladie d'Alzheimer. Les mesures métaboliques par imagerie TEP sont d'ailleurs toujours utilisées de nos jours pour accroître la fiabilité et la spécificité de son diagnostic. L'établissement précoce de cet hypo-métabolisme dans l'hippocampe suggère un rôle potentiel de ce-dernier dans la pathogenèse de la maladie. Les astrocytes étant des cellules fortement glycolytiques, d'aucuns pourraient les percevoir comme des acteurs clefs de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. D'autant plus que l'exposition des astrocytes aux peptides Aβ, qui, rappelons-le, se dépose avant l'apparition de l'hypo-métabolisme, résulte en une signalisation calcique aberrante *in vitro* [159], *in vivo* [160] et *ex vivo* [161]. Ces perturbations calciques pourraient être responsables de déficiences du trafic vésiculaire, donc de la gliotransmission et ainsi de l'activité synaptique [162].

Néanmoins le rôle des astrocytes quant à l'hypo-métabolisme reste flou : seraient-ils responsables de celui-ci ou celui-ci les rendrait-il si vulnérables à la pathologie amyloïde qu'ils participeraient dans un second temps au phénotype hypo-métabolique et de la maladie d'Alzheimer [163] ? Comme évoqué précédemment, la maladie d'Alzheimer affecte les astrocytes en les rendant réactifs (voir section 3.1.1). Grâce à l'utilisation de traceurs spécifiques des astrocytes réactifs en imagerie TEP, des études suggèrent que les

[26] Les auteurs suggèrent ici que l'hypo-métabolisme du glucose participe à rendre les astrocytes vulnérables à la cytotoxicité de l'Aβ, accélérant ainsi la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

astrocytes deviendraient réactifs à des stades très précoces de la maladie, voire même avant l'apparition des symptômes [164], [165]. Quelle est la contribution des astrocytes à l'hypo-métabolisme glucidique dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer ? Pour répondre à cette question, notre équipe a fait le choix de travailler sur le modèle murin 3xTg-AD depuis plusieurs années.

3.3. Le modele murin 3xTg-AD pour l'etude de la maladie d'Alzheimer

Il existe de nombreux modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. Les modèles rongeurs transgéniques représentent la majorité de ceux-ci et possèdent chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Malheureusement, il n'existe pas un seul modèle récapitulant toutes les caractéristiques de la pathologie humaine. Les modèles transgéniques murins sont principalement développés à partir des gènes humains mutés responsables des formes familiales, mettant en lumière une de leurs limites, puisque ces formes représentent une minorité des cas (1 à 5%). Parmi ces modèles (voir la revue de Götz, publiée en 2018, pour une description détaillée des avantages et inconvénients des différents modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer [166]) nous avons choisi le modèle 3xTg-AD car il avait l'avantage de présenter une progression lente, propice à des essais thérapeutiques et des données préliminaires montraient l'existence de déficits métaboliques précoces avant l'apparition des pathologies amyloïde et tau.

3.3.1. Presentation generale du modele

Le modèle 3xTg-AD a été développé par l'équipe de La Ferla en 2003 [167], [168]. Il a été créé à partir d'embryons unicellulaires de souris *knock-in* pour le gène humain muté *PSEN1* (M146V) dans lesquels deux transgènes humains mutés ont été micro-injectés : *APP* (mutation *Swedish*) et *MAPT* (P301L) (Figure I.17-Haut). Les deux transgènes sont intégrés au même locus, sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1.2. Cette intégration groupée permet de s'assurer une lignée transgénique unique de même fond génétique à travers les différentes générations, simplifiant ainsi largement l'entretien de la colonie. Elle oblige néanmoins la génération d'une colonie contrôle de même fond génétique indépendante de la colonie 3xTg-AD.

Le décours de la maladie chez ce modèle est résumé sur la Figure I.17-Milieu. Les déficits synaptiques et cognitifs apparaissent aux alentours de 4-6 mois (voir section 3.3.2), coïncidant avec l'accumulation intracellulaire d'amyloïde [169]. L'apparition des pathologies amyloïde et Tau étant sujette à une forte variabilité entre les colonies de différents laboratoires, un précédente étudiante en thèse de notre équipe a caractérisé leur émergence dans notre colonie (Figure I.17-Bas). La pathologie amyloïde débute aux alentours de 6 mois, avec une première accumulation intra-neuronale. Elle s'empire avec l'âge, et les plaques séniles sont visibles d'abord dans le subiculum et le cortex à 12 mois, puis dans CA1 à 18 mois. Les astrocytes à proximité des plaques deviennent réactifs et les circonscrivent, alors que ceux de l'hippocampe semblent subir une atrophie [170]. La pathologie Tau débute dans le cortex et l'hippocampe aux alentours de 12 mois et s'empire également avec l'âge. Il est à noter que les mâles et les femelles 3xTg-AD ne présentent pas la même sévérité de symptômes. En effet, la maladie commence plus tôt et affecte plus fortement les femelles que les mâles [171], [172]. Néanmoins, aucune étude n'a pu

identifier une perte neuronale significative dans ce modèle, mettant ainsi en avant une limite classique des modèles murins vis-à-vis de l'aspect neurodégénératif de la maladie d'Alzheimer.

Ce modèle présente des déficits synaptiques et cognitifs dont l'apparition précoce permet d'étudier les mécanismes primaires de ces symptômes caractéristiques de la maladie. De plus, ce modèle présente des altérations précoces du métabolisme du glucose (voir section 3.3.3) et des cellules gliales (réactivité, vulnérabilité Aβ), ce qui permet l'étude des relations entre hypo-métabolisme, astrocytes et déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer.

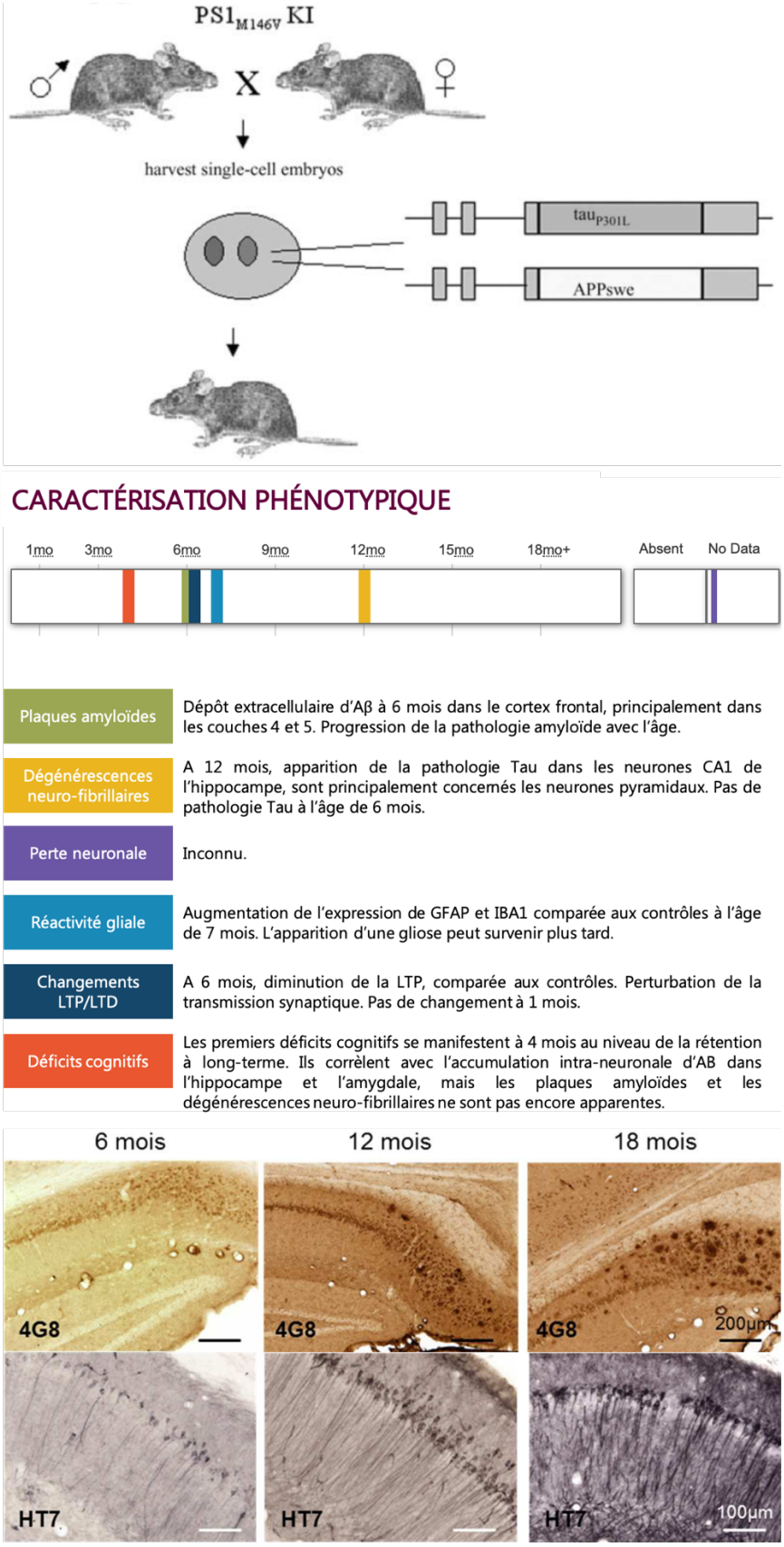


Figure I.17 – Génération et caractérisation du phénotype du modèle murin 3xTg-AD, adaptée de [167], [173], [174]. En **haut**, génération du modèle. Des embryons unicellulaires de souris *knock-in* pour le gène humain muté PSEN1 ont été micro-injectés avec deux transgènes humains mutés (MAPT et APP) sous le contrôle du promoteur Thy1.2. Les embryons générés sont implantés dans une mère porteuse. Au **milieu**, caractérisation de son phénotype. **4 mois**, apparition des premiers déficits de mémoire et accumulation dans les neurones d'Aβ. **6 mois**, dépôt des premières plaques amyloïdes dans le cortex, altération de la LTP et de la transmission synaptique. **7 mois**, la glie devient réactive. **12 mois**, apparition des premières dégénérescences neuro-fibrillaires. Il n'est pas su à ce jour si ce modèle subit une perte neuronale. En **bas**, pathologies amyloïde et Tau dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD en fonction de l'âge. **4G8** (haut) marque les plaques amyloïdes. L'accumulation d'Aβ commence à 6 mois et s'empire avec l'âge. **HT7** (bas) marque la protéine tau humaine. La pathologie tau s'empire avec l'âge. Images acquises au laboratoire.

3.3.2. Les souris 3xTg-AD presentent des deficits synaptiques et cognitifs

La plupart des données résumées ci-dessous sont issues du travail collaboratif que notre équipe a mené et publié récemment [175].

Des analyses électrophysiologiques mettent en évidence une altération de la plasticité synaptique (LTP) dans l'hippocampe des souris femelles 3xTg-AD dès l'âge de 6 mois (Figure I.18-A) [175]. Les tests comportementaux montrent que ces souris présentent également des déficits cognitifs de mémoire à long-terme, dès l'âge de 4 mois (Figure I.18-B). En effet, elles réalisent moins bien que les contrôles le test de la piscine de Morris[27], évaluant la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe [169], [175]. Elles ne présentent aucun trouble moteur, visuel ni de l'apprentissage [175], [176].

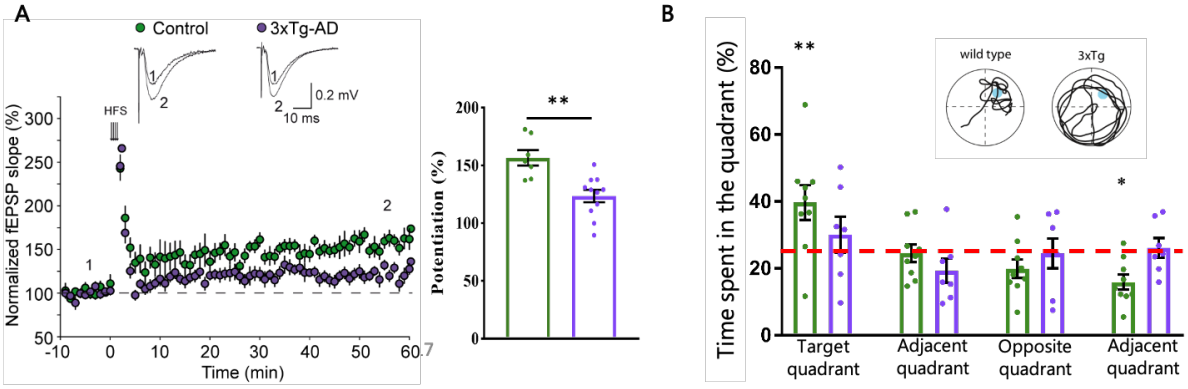


Figure I.18 – Altérations synaptiques et cognitives des souris 3xTg-AD, adaptée de [175]. **A –** Enregistrements électrophysiologiques au niveau de la synapse CA3-CA1. Après stimulation à haute fréquence (HFS) les souris 3xTg-AD présentent une potentialisation synaptique diminuée en comparaison aux souris contrôles. **B -** Résultats du test comportemental de la piscine de Morris. 72h après la période d'apprentissage, les souris 3xTg-AD ne se souviennent pas de la localisation de la plateforme. Elles passent un temps équivalent dans chaque cadran de la piscine, contrairement aux souris contrôles qui passent la majorité de leur temps dans le cadran cible. En **haut**, réponse typique d'une souris contrôle et d'une souris 3xTg-AD lors du test. La **ligne rouge** matérialise 25% du temps.

3.3.3. Le cerveau des souris 3xTg-AD presente des alterations metaboliques

Une seule étude s'était intéressée au métabolisme du glucose dans le cerveau de ce modèle murin [177]. Notre équipe a identifié plusieurs altérations métaboliques dans le cerveau de ces souris. Par autoradiographie couplée à une cartographie statistique paramétrique (*statistical parametric mapping based on voxel-wise analysis*), nous avons pu mettre en évidence la présence de clusters hypo-métaboliques dans l'hippocampe, l'amygdale et le cortex entorhinal de ces souris[28] (Figure I.19-A & B) [175]. L'utilisation de sondes FRET[29] sensibles au lactate (*laconic*) nous a également permis de mettre en avant une altération du flux glycolytique chez ces souris (altération de la production de lactate)

[27] Voir chapitre II section 11 pour la description du test comportemental de la piscine de Morris.
[28] Ces souris présentent également des clusters hyper-métaboliques dans le striatum, le cortex auditif et le cortex rétrosplénial.
[29] Voir chapitre V, annexe 1.

(Figure I.19-C & D) **[175]**. Ces études ont été réalisées sur des souris âgées de 6 et 12 mois, et les altérations ont pu être identifiées dès l'âge de 6 mois, avant donc l'apparition des pathologies amyloïde et tau. Comme pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les déficits métaboliques des souris 3xTg-AD apparaissent de façon précoce.

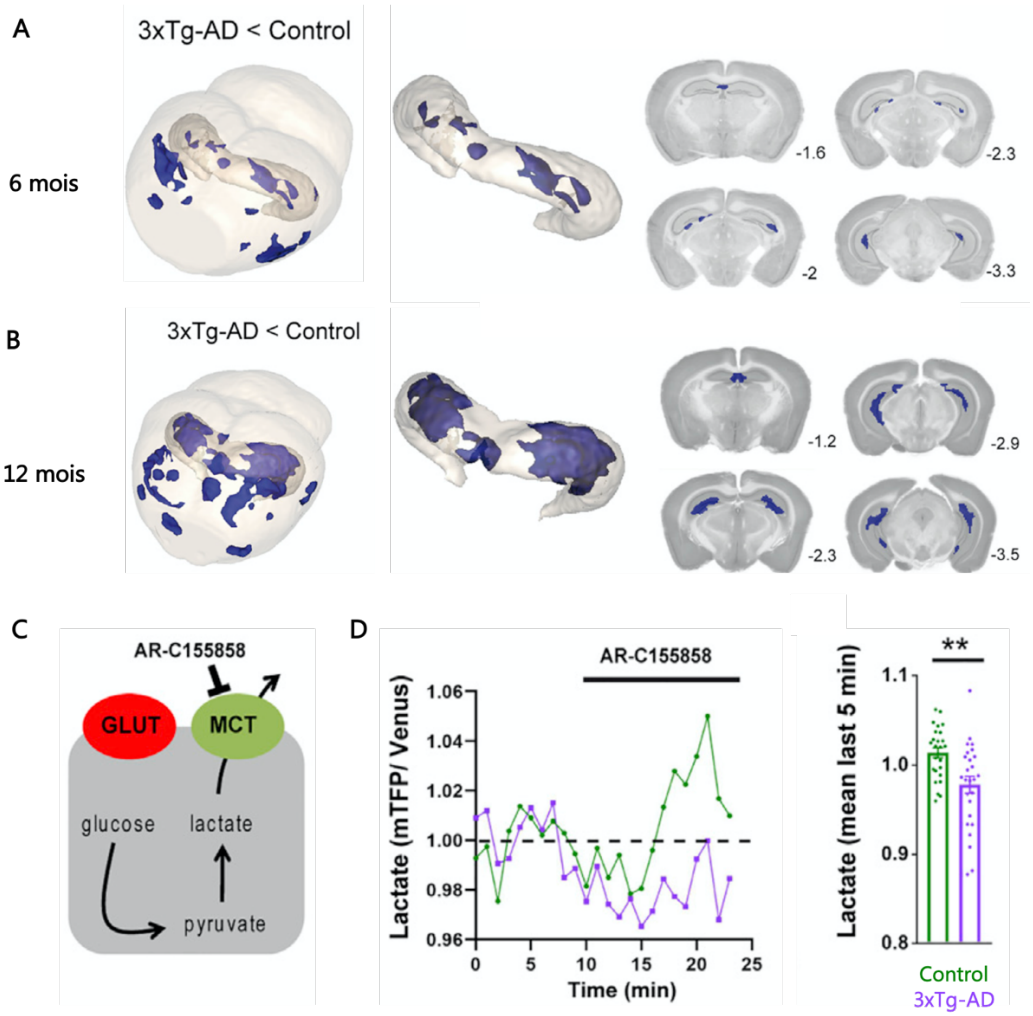


Figure I.19 – Altérations métaboliques du cerveau des souris 3xTg-AD, adaptée de [175]. A & B - Clusters hypo-métaboliques (**bleu**) identifiés par autoradiographie dans le cerveau des souris 3xTg-AD à 6 mois (**A**) et 12 mois (**B**). A **droite**, zoom sur l'hippocampe. Les nombres indiquent la position anatomique relative au Bregma. La taille et le nombre des clusters augmentent avec l'âge. **C & D -** Mesure FRET. Des tranches d'hippocampe, dont les astrocytes expriment la sonde *laconic*, sont plongées dans un bain contenant 1 µM AR-C155885, inhibiteur des transporteurs MCT entraînant l'accumulation intracellulaire de lactate (**C**). Le ratio des fluorescences mTFP (donneur)/Venus (accepteur) est calculé pour rendre compte de la concentration intracellulaire en lactate. L'inhibition du transporteur n'engendre pas d'accumulation du lactate chez les souris 3xTg-AD (**D**), suggérant une production de lactate altérée dans ce modèle.

3.3.4. AMELIORATION DES DEFICITS SYNAPTIQUES ET COGNITIFS PAR LA D-SERINE

Notre équipe a montré que les déficits synaptiques et cognitifs peuvent être compensés par l'addition de D-sérine [175]. La potentialisation à long-terme des synapses, corrélat moléculaire de la mémoire, est dépendante de l'ouverture des récepteurs NMDA. Comme évoqué précédemment, ces récepteurs ne s'ouvrent que lorsque que le glutamate et un co-agoniste s'y sont fixés. Ce co-agoniste peut-être la glycine, mais est préférentiellement la D-sérine au niveau des synapses de l'hippocampe (voir section 2.1.1). Lorsque, lors des enregistrement électrophysiologiques, est ajoutée de la D-sérine (Figure I.20-A) dans la chambre d'expérimentation, la LTP des 3xTg-AD est équivalente à celle des souris contrôles. La supplémentation en D-sérine améliore également les capacités cognitives des souris 3xTg-AD, testées par le test comportemental de la piscine de Morris (Figure I.20-B). Pendant deux semaines, les souris reçoivent de la D-sérine via leur eau de boisson, incluant la période de test. Lors du test, les souris 3xTg-AD ayant reçu la D-sérine performent aussi bien que les souris contrôles.

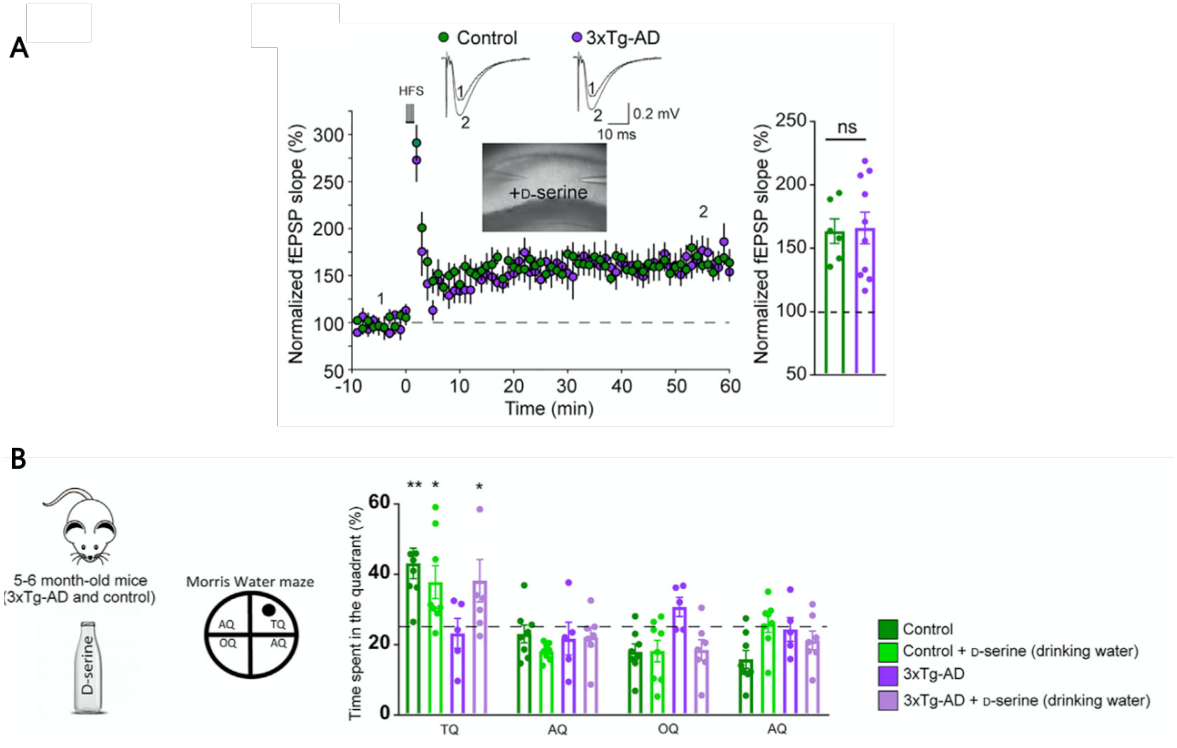


Figure I.20 – Amélioration des déficits synaptiques et cognitifs par la D-sérine, adaptée de [175]. **A -** Enregistrements électrophysiologiques au niveau de la synapse CA3-CA1 en présence de 50 µM de D-sérine dans la chambre d'enregistrement. Après stimulation à haute fréquence (HFS) les souris 3xTg-AD présentent une potentialisation synaptique identique à celle des souris contrôles. **B -** Résultats du test de la piscine de Morris 72 h après la phase d'apprentissage. Les souris ont reçu une supplémentation en D-sérine via l'eau de boisson durant deux semaines (600 mg.L^{-1}). Les souris 3xTg-AD ayant reçu le traitement D-sérine passent plus de temps dans le cadran cible que celles ne l'ayant pas reçu, réalisant aussi bien que les souris contrôles. **TQ**, cadran cible ; **AQ**, cadran adjacent ; **OQ**, cadran opposé.

Plusieurs publications ont déjà fait montre d'un manque de D-sérine à la synapse, résultant en une LTP altérée et/ou des déficits cognitifs, et plus particulièrement dans le contexte du vieillissement [178]–[180]. Nos résultats suggèrent qu'une altération de la production ou de la libération de D-sérine pourrait expliquer les déficits électrophysiologiques et cognitifs de ces souris. De façon très précoce, la maladie d'Alzheimer affecte le métabolisme du glucose, essentiel à la neurotransmission et à l'homéostasie cérébrale (voir section 1) et dont est issue, entre autre, la L-sérine, précurseur obligatoire de la D-sérine. Nos études sur le modèle murin 3xTg-AD suggèrent un rôle prépondérant de cet hypo-métabolisme dans la pathogenèse de la maladie. Il est probable que la production de L-sérine soit impactée par cet hypo-métabolisme, expliquant alors les déficits observés liés à la D-sérine chez les souris 3xTg-AD. De plus, la perturbation du métabolisme de la L-sérine peut avoir d'autres conséquences dramatiques que l'altération des niveaux de D-sérine sur la physiologie du cerveau, puisqu'elle est le point central d'un grand nombre de voies métaboliques essentielles.

La prochaine partie s'attachera à récapituler les connaissances actuelles sur la synthèse de la L-sérine, son implication dans le métabolisme cellulaire et la neurotransmission, les conséquences connues d'un déficit de sa production dans le cerveau ainsi que sa potentialité thérapeutique.

4. LE METABOLISME DE LA L-SERINE DANS LE CERVEAU

La L-sérine est un des acides aminés les plus fréquemment retrouvés dans les protéines des vertébrés. Elle fut découverte en 1865 par le chimiste Emil Cramer dans les protéines de la soie **[181]** et classée parmi les acides aminés non-essentiels. La majorité de ce qui est connu de son métabolisme relève du domaine de l'oncologie. En effet, son implication dans la prolifération cellulaire[30] en a fait l'objet d'actives recherches dans ce domaine. La L-sérine est le précurseur de la glycine et de la cystéine, tous trois étroitement liés au métabolisme du carbone (*one-carbon metabolism*), couplant différentes voies métaboliques pour la génération de briques élémentaires constitutives des cellules (lipides, protéines, acides nucléiques) **[39], [182]** (voir section 4.2.2). L'augmentation de la synthèse de L-sérine est un changement métabolique fréquent dans les tumeurs, et ces dernières sont nombreuses à fortement dépendre de la biodisponibilité en L-sérine pour leur croissance **[183], [184]**.

Bien que peu étudiée dans le cerveau, la L-sérine pourrait y jouer un rôle central. Elle participe à la neurotransmission puisque, entre autre, elle est nécessaire à la synthèse de la D-sérine et de la glycine, tous deux co-agonistes des récepteurs NMDA. En plus de son importance dans la prolifération cellulaire, la L-sérine exerce également un effet trophique sur les neurones en culture, sa supplémentation augmentant la longueur et la complexité des neurites *in vitro* **[185], [186]**. Ses rôles dans la neurotransmission (voir section 4.2.2) et le fait qu'elle soit produite à partir d'un intermédiaire de la glycolyse (voir section 4.1.1) suggèrent, au su des précédentes sections, des interactions métaboliques entre neurones et cellules gliales pour répondre aux besoins physiologiques du cerveau en L-sérine.

4.1. LA BIOSYNTHESE DE LA L-SERINE DANS LE CERVEAU : LE *PHOSPHORYLATED PATHWAY*

La L-sérine est un acide aminé non-essentiel, ce qui signifie qu'il peut être produit *de novo* par les cellules et qu'un apport alimentaire n'est pas indispensable. En 1965 Bridgers démontre que la L-sérine peut être produite *de novo* dans le cerveau des mammifères via le *phosphorylated pathway* (PP), préalablement connu chez les bactéries **[187]**. Cette synthèse *in situ* permettrait de compenser l'apport insuffisant de la circulation sanguine, puisque la L-sérine ne passe que peu la BHE (barrière hémato-encéphalique) **[188]**.

4.1.1. LE GLUCOSE COMME PRECURSEUR DU PP

Le PP démarre à partir du 3PG, le 6ème intermédiaire de la glycolyse (Figure I.21). Il est dévié de la voie par la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) qui catalyse la première des trois réactions du PP. La Phgdh oxyde le 3PG en 3-phosphohydroxypyruvate (3PHP) à l'aide du co-facteur NAD^+. Le 3PHP est ensuite pris en charge par la phosphoserine aminotransférase 1 (PSAT1) qui transfère le groupe amine du L-glutamate[31]

[30] La supplémentation en L-sérine dans un milieu de culture permet d'accroître la croissance cellulaire bien plus que n'importe quel autre acide aminé **[319]**.
[31] Alors rétro-converti en α-KG.

vers 3PHP pour produire la 3-phosphosérine (3PS). La dernière étape est catalysée par la phosphosérine phosphatase (PSPH) qui hydrolyse la 3PS en L-sérine et libère un phosphate inorganique (Pi).

Le 3PG peut provenir de deux sources, soit le glucose via la glycolyse, soit le phosphoénolpyruvate (PEP), via la néoglucogenèse, mais cette dernière est vraisemblablement minoritaire. L'utilisation de [U-^{13}C]-Glucose[32] en culture cellulaire a d'ailleurs montré que le glucose est le substrat principal pour la production de L-sérine dans les cellules cancéreuses [189]. La fraction de 3PG utilisée pour la synthèse de L-sérine n'est pas connue dans le cerveau (environ 10% dans certaines cellules cancéreuses).

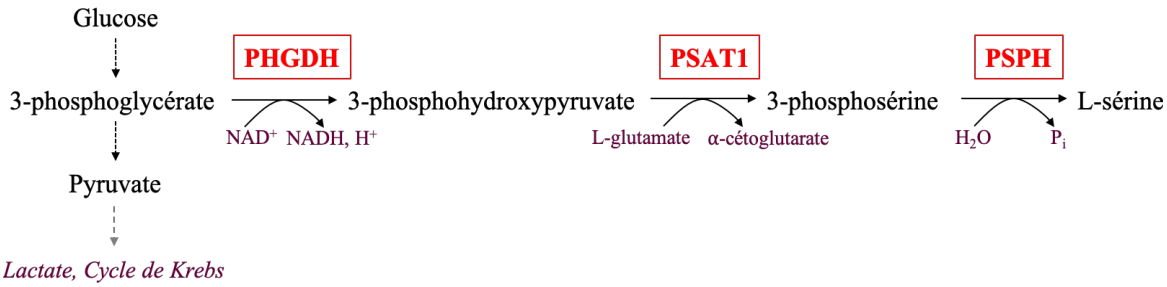


Figure I.21 – Le *phosphorylated pathway* produit la L-sérine à partir de la glycolyse. Le PP est une courte voie métabolique débutant à partir de la glycolyse. Le 3PG est dévié par la PHGDH pour produire du 3PHP en consommant une molécule de NAD^+. 3PHP est métabolisé en 3PS par l'action de PSAT1 qui utilise le L-glutamate comme donneur du groupe amine. La dernière étape consiste en l'hydrolyse de la 3PS par PSPH pour produire de la L-sérine.

Il existe également d'autres voies permettant aux cellules de régénérer la L-sérine comme la conversion de la glycine en L-sérine ou la dégradation des protéines. L'inter-conversion L-sérine-glycine est couplée au cycle du folate dans le métabolisme du carbone (voir section 4.2.2) et est catalysée par la s/gHMT [182]. Le recyclage des acides aminés à partir de la dégradation des protéines permet une économie de substrats et son importance dans le cerveau est probable étant donné que l'extraction des acides aminés à partir du sang y est assez restreinte. Ces voies alternatives ne sont cependant pas les plus actives pour la production de L-sérine pour le cerveau. En effet, des souris Phgdh-KO (*knock-out*) ont été produites par délétion ciblée dans des cellules souches embryonnaires [190]. Les embryons se développent alors anormalement et périssent à E13.5, mettant en lumière une fois de plus l'importance de la L-sérine pour les cellules proliféatrices mais suggérant également que la majorité de la L-sérine nécessaire au développement provienne de sa synthèse *de novo* par le PP. L'utilisation de souris Phgdh$^{Flox/Flox}$, décrite dans la section suivante, suggère que la L-sérine nécessaire à la physiologie du cerveau adulte est également majoritairement originaire du PP.

[32] Le [U-^{13}C]-Glucose est une molécule de glucose dont les six atomes carbones sont ^{13}C, isotope non radioactif. Après administration, ce glucose est métabolisé par les cellules est les métabolites produits spécifiquement à partir de ce glucose ^{13}C peuvent être isolés et identifiés par spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire ^{13}C.

4.1.2. La biosynthese de la L-serine, une affaire d'astrocytes

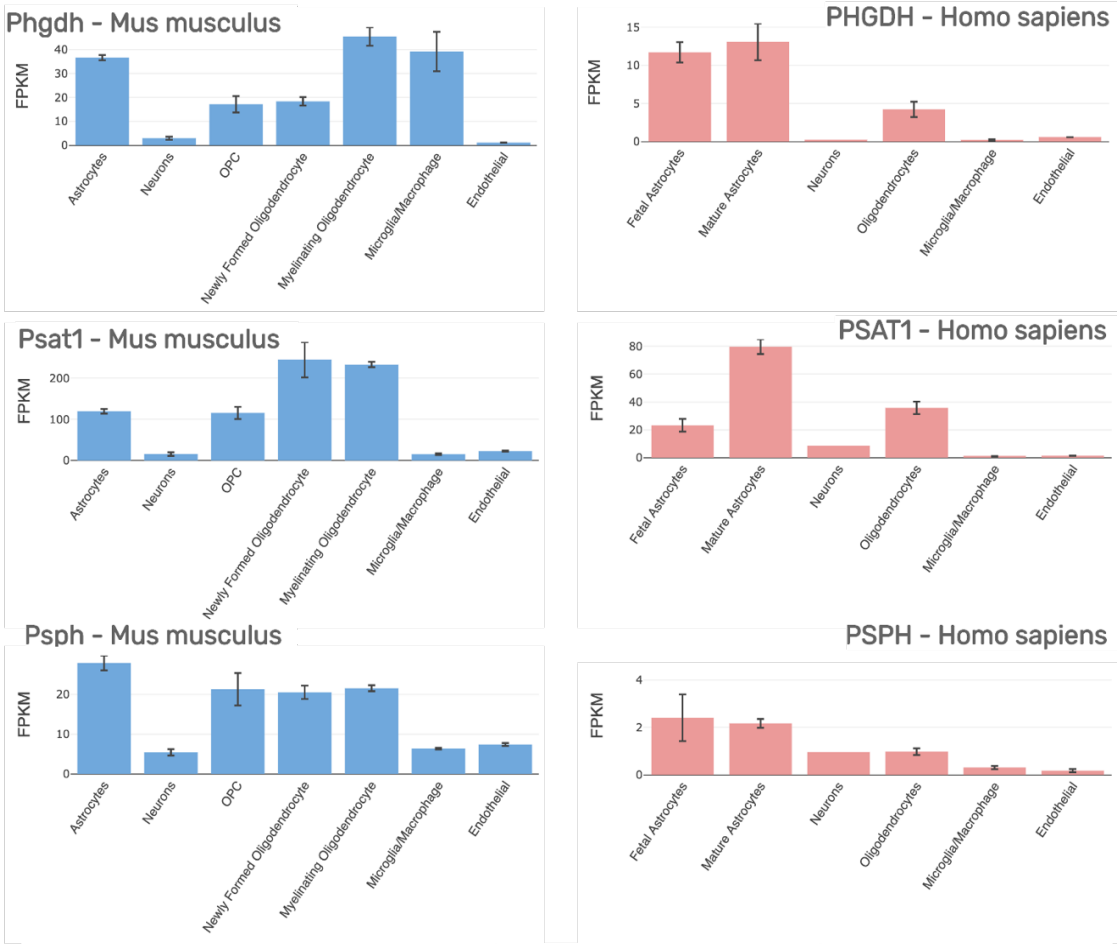
Le fait que la production de L-sérine dérive de la glycolyse suggère qu'elle se produise majoritairement dans les cellules gliales. Les premières études cherchant à localiser l'expression cellulaire de la PHGDH dans le cerveau ont été réalisées par immunohistochimie et hybridation *in situ* chez la souris. Elles ont montré que les cellules souches neurales expriment la PHGDH, mais que cette expression est perdue une fois la différentiation neuronale établie **[191], [192]**. Dans le cerveau adulte des souris, la PHGDH est alors retrouvée dans les astrocytes de nombreuses régions du cerveau.

Les études transcriptomiques sur cellules triées murines (du cortex à P7) et humaines (cellules du cortex du lobe temporal obtenues dans le cadre de chirurgies), réalisées par l'équipe de Ben Barres, ont permis d'établir une base de données dans laquelle il est possible de rechercher quel type de cellule est enrichi en tel ou tel transcrit **[16], [17], [193]**. Les données murines et humaines dans le contexte du PP sont assez similaires et montrent un enrichissement des transcrits dans les astrocytes et les oligodendrocytes (Figure I.22-A). Une autre base de données obtenue à partir d'études transciptomiques *single-cell* sur cellules du cerveau adulte de souris permet de chercher quel type cellulaire exprime une combinaison de transcrits **[18], [194]**. La combinaison des trois transcrits du PP est retrouvée dans les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules gliales satellites et entériques (cellules prolifératrices) (Figure I.22-B). Par la suite, notre équipe a confirmé ces résultats par immunohistochimie sur tissus murins, primates non-humains (*Macaca fascicularis*) et humains **[175]** ainsi que par biochimie sur des protéines extraites de cultures cellulaires primaires de souris (voir chapitre III section 1).

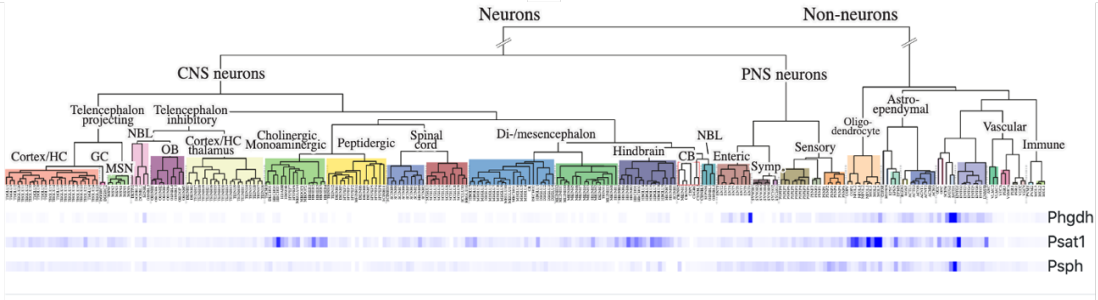
De plus, le groupe de Shigeki Furuya a développé un modèle murin possédant le gène de la Phgdh floxé, permettant ainsi une étude des effets de la délétion de ce gène par stratégie Cre/Lox. La délétion du gène spécifiquement dans les astrocytes de l'hippocampe entraîne une diminution de 80% de la concentration en L-sérine dans le tissu **[175], [195]**. Cette délétion diminue également les niveaux de D-sérine et de glycine et impacte largement la cognition des animaux **[175]**. Ensemble, ces résultats confirment la production astrocytaire de L-sérine à partir du métabolisme du glucose, qui elle-même est critique pour maintenir des niveaux de glycine et D-sérine physiologiques. La production oligodendrocytaire de L-sérine, si elle est confirmée, ne semblerait pas jouer un rôle important dans la biodisponibilité en L-sérine. Cela s'expliquerait par une production à la demande, *id est* immédiatement utilisée après synthèse pour la production des lipides constituant la myéline (voir section 4.2.3), comme en sont capables les oligodendrocytes **[12]**. Le fait que la production de L-sérine soit restreinte aux cellules gliales suggère l'existence d'une navette pour répondre aux besoins des neurones. Les transporteurs impliqués ne seront pas discutés ici, mais plus d'informations peuvent être trouvées dans la revue de Furuya et Watanabe, publiée en 2003 **[196]** et sont évoqués en section 2.1.1.

Enfin, comme évoqué précédemment, la plupart des connaissances actuelles sur le métabolisme de la L-sérine a été obtenue dans le domaine de l'oncologie. Le fait que les astrocytes partagent certaines similitudes avec les cellules cancéreuses (prolifération, effet Warburg et réactions anaplérotiques, capacités angiogéniques, …) **[79]** permet d'extrapoler, avec toutes les précautions nécessaires, ces découvertes aux astrocytes. Ainsi, les découvertes concernant la L-sérine dans les cancers permettent d'émettre des hypothèses quant au métabolisme de la L-sérine dans le cerveau.

A



B



Index	Name	Description	Phgdh	Psat1	Psph
221	MOL1	Mature oligodendrocytes	0.308	0.932	0.386
223	MOL3	Mature oligodendrocytes, spinal cord enriched (high Klk6)	0.700	1.84	0.657
231	ACTE1	Telencephalon astrocytes, fibrous	0.411	0.450	0.316
236	ACMB	Dorsal midbrain Myoc-expressing astrocyte-like	0.358	0.323	0.278
242	SATG1	Satellite glia, proliferating	2.17	0.534	2.90
243	ENTG1	Enteric glia, proliferating	0.786	1.77	0.608

Figure I.22 – Les transcrits du *phosphorylated pathway* sont exprimés dans les astrocytes et les oligodendrocytes, adaptée de [193], [194]. **A -** Enrichissement des transcrits du PP dans les oligodendrocytes et les astrocytes chez la souris et l'humain. **OPC**, précurseurs d'oligodendrocytes. **B -** La combinaison des trois enzymes du PP est retrouvée dans les oligodendrocytes et les astrocytes chez la souris.

4.2. LES ROLES DE LA L-SERINE DANS LE CERVEAU

Le PP en lui-même revêt une importance critique pour la physiologie et le métabolisme du cerveau. En effet, le PP consomme et produit des co-facteurs (NADH/NAD^+, L-glutamate et α-KG) dont la disponibilité peut être déterminante dans le cerveau (synthèse de neurotransmetteurs, production d'ATP, défenses anti-oxydantes, etc.). Par exemple, la supplémentation en L-sérine, après inhibition de la PHGDH, est insuffisante pour rétablir totalement la *fitness* cellulaire [183].

La L-sérine est, quant à elle, essentielle à de nombreuses fonctions du cerveau, détaillées ci-dessous (Figure I.23), et participant à l'homéostasie cérébrale. Celles-ci incluent la régulation de la glycolyse, la neurotransmission, la morphologie et la prolifération cellulaires, les défenses anti-oxydantes et l'épigénétique.

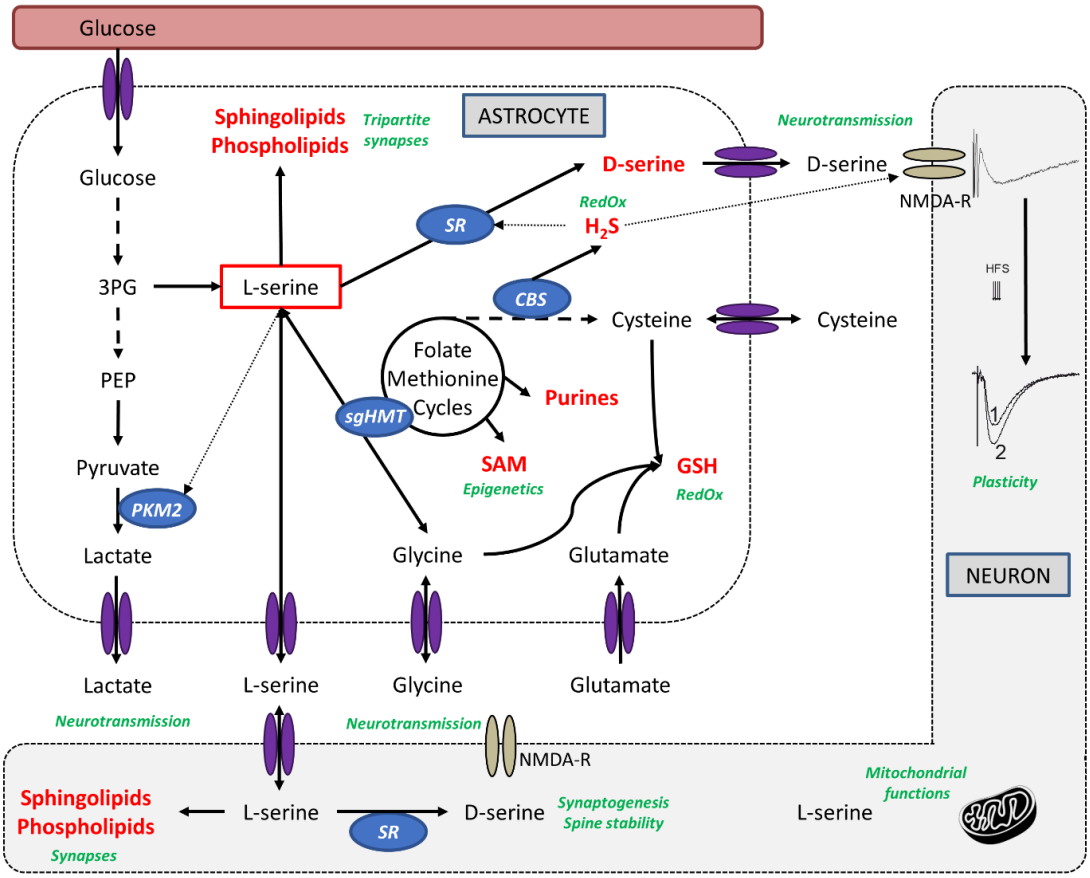


Figure I.23 – La L-sérine astrocytaire est un *hub* métabolique dans le cerveau et remplit de nombreuses fonctions. La L-sérine joue de nombreux rôles dans la physiologie du cerveau (**vert**). Elle est essentielle pour la neurotransmission et la plasticité synaptique, étant le précurseur de la glycine et de la D-sérine. En régulant le flux glycolytique par son interaction avec PKM2, la L-sérine peut altérer la production de lactate, modulateur de la signalisation NMDA. Le couplage de la L-sérine au cycle du carbone contribue à la régulation du statut rédox des cellules (synthèse de GSH), aux modifications épigénétiques des cellules (synthèse de S-adénosylméthionine, SAM), à la régénération du *pool* de nucléotides (synthèse de purines) et à la production de sulfure d'hydrogène (H_2S), un gasotransmetteur régulant l'activité NMDA. La L-sérine participe également à l'homéostasie des synapses et des fonctions mitochondriales par la production de céramides, squelette des sphingolipides, et de phospholipides.

4.2.1. L-SERINE & GLYCOLYSE

Comme décrit précédemment, la majorité de la L-sérine dans le cerveau dérive du catabolisme du 3PG. La L-sérine n'exerce aucune régulation sur les enzymes du PP, suggérant l'existence d'autres mécanismes de régulation pour répondre aux besoins cellulaires en L-sérine.

Un mécanisme a notamment été suggéré, selon lequel la L-sérine peut se lier à la pyruvate kinase et l'activer **[197]**. Il a été montré dans le contexte de cancer du côlon que la L-sérine, en se liant à l'isoforme PKM2 de la pyruvate kinase, est capable d'induire une conformation en tétramère de ce dernier, le rendant fortement actif **[34]** (Figure I.23). Lorsque la production de L-sérine est suffisante, PKM2 est fortement active et augmente le flux glycolytique vers la production de lactate. Inversement, lorsque la cellule manque de L-sérine, l'activité de PKM2 est diminuée, permettant une accumulation d'intermédiaires glycolytiques, dont le 3PG qui peut être redirigé vers la synthèse de L-sérine **[198]**. Cette déviation est permise également par l'accumulation du 2-phosphoglycérate (7ème intermédiaire glycolytique) qui est un activateur de la PHGDH **[199]**.

De plus, certaines conditions expérimentales altérant le flux du PP ont pour conséquences d'affecter le métabolisme du glucose. En effet, la délétion génétique de Phgdh altère les niveaux de nombreux intermédiaires glycolytiques **[189]**. L'ablation de PHGDH ou PSPH entraîne une augmentation de la production de lactate, suggérant une augmentation du flux glycolytique, comme prédit par les modèles computationnels **[200]**. En culture cellulaire, la privation de L-sérine empêche les cellules de réguler leur flux glycolytique **[201], [202]** et l'inhibition pharmacologique de PHGDH altère la voie du pentose phosphate et le cycle de Krebs **[203]**.

Ces résultats montrent que le flux du PP est capable de réguler le flux de la glycolyse via, notamment, la modulation de l'activité de PKM2, et qu'en retour, la glycolyse contrôle la production de la L-sérine via la disponibilité en intermédiaires glycolytiques. Dans le cerveau, ce sont les astrocytes qui expriment l'isoforme PKM2 de la pyruvate kinase (voir section 1.3.2), suggérant que cette boucle de régulation puisse y avoir lieu, contrairement aux neurones. De plus, la L-sérine promeut la synthèse de lactate par la glycolyse aérobie, qui est une caractéristique des astrocytes (voir section 1.3.2). Ensemble, ces résultats étayent également l'hypothèse gliale du PP.

4.2.2. L-SERINE & NEUROTRANSMISSION ET METABOLISME DU CARBONE

La L-sérine est le précurseur de la D-sérine et de la glycine, deux co-agonistes des récepteurs NMDA (voir section 2.1.1). La conversion de la L- en D-sérine est catalysée par la SR, une enzyme dépendante du 5'-phosphate pyridoxal. La délétion ciblée de la SR dans le cerveau de souris réduit de 80 à 90% les niveaux de D-sérine, confirmant ainsi son rôle majeur dans la production de D-sérine **[204], [205]**. Comme évoqué en section 2.1.1, l'origine cellulaire dans le cerveau de cette racémisation est largement débattu et dépend certainement d'une navette L-sérine (Figures I.23 et I.25). De façon intéressante, la SR catalyse également l'α,β-élimination de l'eau à partir de la L- ou D-sérine **[206]**. Cette élimination produit du pyruvate, substrat principal du métabolisme énergétique oxydatif. La participation de cette voie dans le métabolisme énergétique des neurones ou dans la production astrocytaire de lactate est inconnue et mériterait d'être testée.

Le rôle de la D-sérine dans la transmission et la plasticité synaptique a été largement décrit dans multiples revues [207], [208] et ne sera donc pas détaillé ici. On peut néanmoins noter que son rôle ne se limite pas à la plasticité synaptique [209]. En effet, sa liaison aux récepteurs NMDA affecte également la prolifération cellulaire dans le gyrus denté [210], la migration neuronale durant le développement du cervelet [211], la synaptogenèse [212], la morphologie des dendrites [213], [214], la densité des épines dendritiques [213], [215] ainsi que leur stabilité et l'intégration synaptique [213], [216].

La conversion de la L-sérine en glycine est catalysée par la s/gHMT et alimente[33] le métabolisme du carbone, composé des cycles du folate et de la méthionine (Figures I.23 et I.24) [182]. Ces cycles transfèrent une unité carbone d'un substrat à l'autre dans le but de régénérer la biomasse de précurseurs, dont notamment la base azotée purine ou encore l'acide aminé méthionine. Le métabolisme du carbone joue donc un rôle prépondérant dans la prolifération cellulaire ainsi que l'épigénétique, par la génération de S-adénosylméthionine (SAM) via le cycle de la méthionine (voir section 4.2.5).

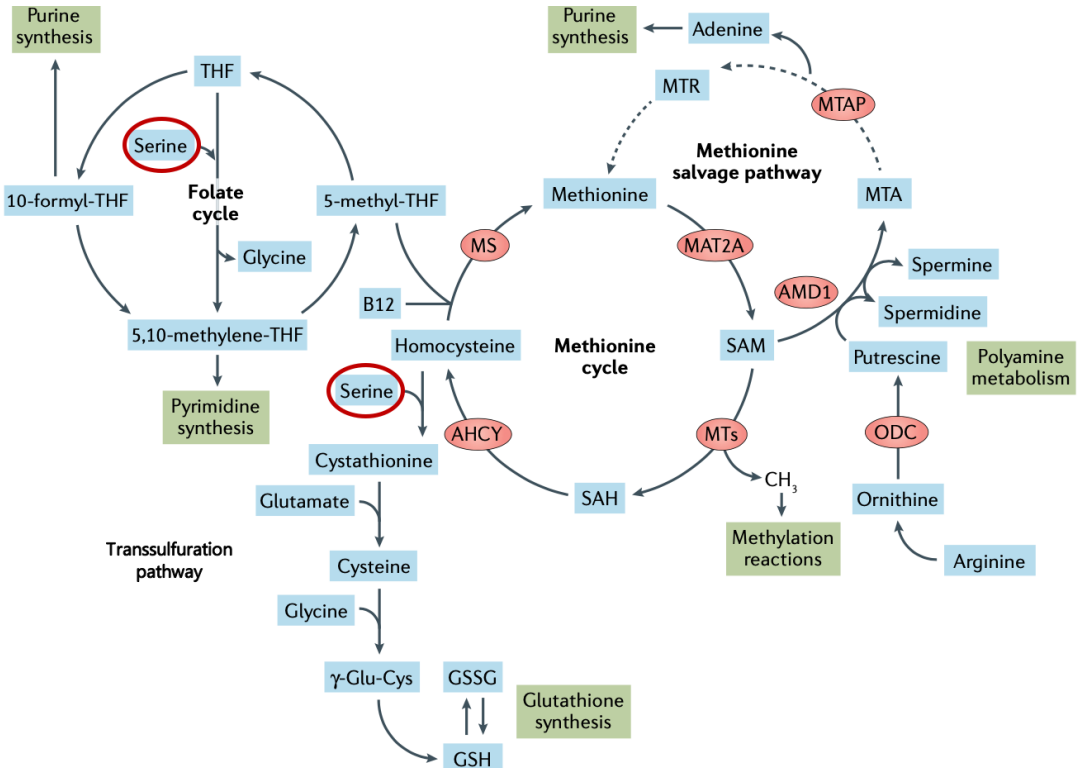


Figure I.24 – Implication de la L-sérine dans les cycles du folate et de la méthionine et dans la voie de transsulfuration, adaptée de [217]. La L-sérine (**cerclée de rouge**) permet d'alimenter le cycle du folate en régénérant le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate. L'imbrication des cycles du folate et de la méthionine permet de régénérer la biomasse de précurseurs (**vert**). La voie de transsulfuration démarre à partir de l'homocystéine, intermédiaire du cycle de la méthionine, et de la L-sérine pour aboutir à la synthèse de cystéine. Cette-dernière appartient également à la biomasse de précurseurs et est utilisée pour la synthèse de GSH. **THF**, tétrahydrofolate.

[33] Un groupement méthylène est transféré de la L-sérine au tétrahydrofolate pour former le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate, qui peut ensuite poursuivre le cycle du folate, et la glycine (Figure I.24).

Le cycle de la méthionine est quant à lui couplé à la voie de transsulfuration (*transsulfuration pathway*) (Figure I.24). Au cours de cette voie, l'atome soufré de l'homocystéine est transféré à la L-sérine pour former la cystéine, régénérant également la biomasse de précurseurs. Ce transfert est catalysé par la cystathione β-synthase (CBS). De façon intéressante, cette enzyme est également responsable de la désulfhydration de la cystéine et/ou de l'homocystéine, résultant en la production de sulfure d'hydrogène (H_2S). Il existe trois différentes enzymes pour la production de H_2S, mais CBS est la seule fortement exprimée dans le cerveau **[218]**.

Dans le cerveau, H_2S a été décrit comme un gasotransmetteur jouant un rôle dans la transmission synaptique à différents niveaux. Il est capable de sulfhydrater la sous-unité NR2A des récepteurs NMDA, ce qui empêche l'inhibition de ces récepteurs par Zn^{2+} dans la fente synaptique, régulant ainsi la transmission glutamatergique **[219]**. Il promeut également l'expression de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA, qui jouent un rôle dans la plasticité synaptique **[220]**. Enfin, il est capable d'augmenter l'activité de la SR en la sulfhydratant, facilitant ainsi l'établissement de la LTP **[221]**. Il est à noter que Keap1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*), inhibiteur du facteur de transcription NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), est également la cible de sulfhydration par H_2S **[222], [223]**. Cette modification faciliterait la translocation nucléaire de NRF2 et ainsi la transcription de ses gènes-cibles, dont les trois gènes du PP **[224]**.

CBS est une enzyme localisée dans les astrocytes **[225]**, les plaçant ainsi comme principal site de production de H_2S dans le cerveau. H_2S peut être stocké de trois façons différentes dans les cellules : les sulfures labiles aux acides (*acid-labil sulfurs*) dans les mitochondries qui libèrent du H_2S en conditions acides ; les sulfures liés (*bound sulfurs*) dans le cytoplasme qui libèrent du H_2S en conditions basiques et le H_2S libre, à des concentrations si faibles (<10 µM) qu'il ne peut être facilement détecté **[226]**. Le H_2S utilisé lors de la transmission synaptique serait probablement libéré par les astrocytes à partir de la réserve de sulfures liés, puisque la recapture du potassium par les astrocytes lors de la transmission synaptique entraîne la basification de leur cytoplasme, propice à la libération de cet H_2S **[226]**. Ces résultats démontrent une fois de plus l'importance des interactions neurones-astrocytes dans la transmission et la plasticité synaptique.

4.2.3. L-SERINE & LIPIDES

Comme évoqué précédemment, la L-sérine est le seul acide aminé à exercer un effet trophique sur les neurones. Bien que les mécanismes par lesquels cet effet est rendu possible sont peu connus **[227]**, une explication pourrait impliquer le métabolisme des lipides (Figure I.23). Par exemple, durant le développement, les astrocytes exercent un effet synaptogénique sur les neurones par la libération de nombreuses molécules, dont des lipides comme le cholestérol **[228]**. Les lipides représentent 50% de la matière sèche du cerveau et sont principalement retrouvés sous forme de sphingolipides, phospholipides et de cholestérol. Ils sont les composants majoritaires de la myéline (70 à 85%) et des membranes plasmiques (30 à 40%). Au niveau des membranes, les radeaux lipidiques (*lipid rafts*)[34] sont enrichis en sphingolipides.

[34] Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines membranaires participant au trafic vésiculaire et à l'exocytose, au transport membranaire, à l'adhésion cellulaire ou encore à la survie cellulaire.

La L-sérine joue un rôle primordial dans la synthèse des lipides. Elle est un constituant de la PS (voir section 1.4.2) et un substrat obligatoire de la synthèse de la céramide, le squelette moléculaire commun à tous les sphingolipides (Figure I.25). En plus des rôles structurels, de signalisation (membrane) et dans la transmission synaptique (myéline), il a récemment été montré que la céramide, dépendante de la L-sérine, joue un rôle dans l'intégrité mitochondriale. En effet, une privation de L-sérine perturbe le métabolisme des lipides, engendrant une fragmentation accrue des mitochondries, responsable d'un dérèglement de leurs fonctions [229]. Ces résultats démontrent l'importance des interactions neurones-astrocytes dans la plasticité et l'homéostasie du cerveau, et étayent l'hypothèse d'une navette sérine entre ces deux types cellulaires (Figure I.25). La composition importante de la myéline en sphingolipides explique la présence des enzymes du PP dans les oligodendrocytes, responsables de la myélinisation des axones.

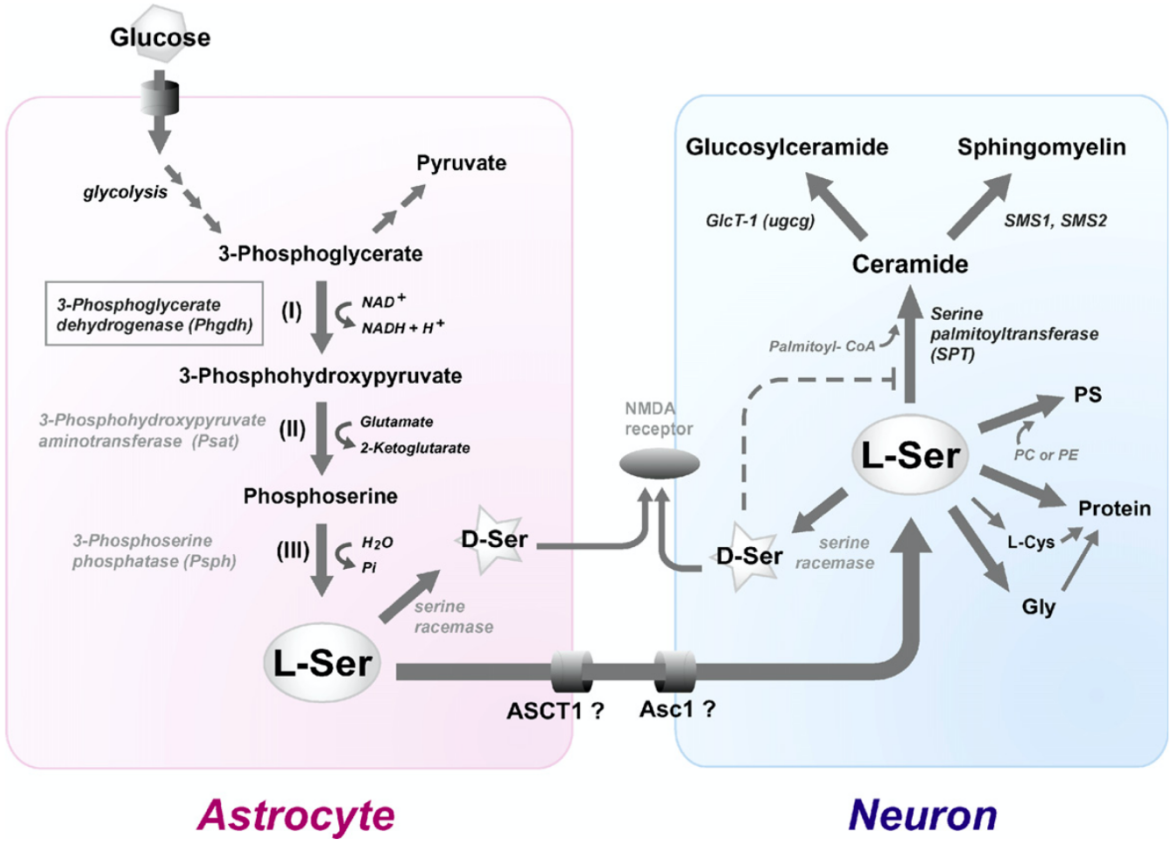


Figure I.25 – Interactions neurones-astrocytes dans le métabolisme des lipides [227]. La L-sérine produite par les astrocytes est transférée aux neurones par le biais d'une navette L-sérine. Par une suite de 4 réactions enzymatiques, dont la fusion du groupe pamitoyl-CoA, elle est métabolisée en céramide, squelette moléculaire commun à tous les sphingolipides. Elle est également utilisée pour la synthèse de phosphatidylsérine (**PS**). A noter que le métabolisme des lipides décrit dans les neurones se produit également dans les astrocytes pour leurs propres besoins. **GlcT-1**, glucosylcéramide transférase 1 ; **SMS1/2**, sphingomyéline synthase 1/2 ; **PC**, phosphatidylcholine ; **PE**, phosphatidyléthanolamine ; **ASCT1**, alanine-serine-cystein-threonine transporter 1 ; **Asc1**, alanine-serine-cystein transporter 1.

4.2.4. L-SERINE & ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

La section 1.4.1 évoque le rôle du glucose dans l'homéostasie des ROS comme précurseur du GSH et régénérateur de NADPH, nécessaire à la réduction du GSSG en GSH. Nous ajouterons simplement ici que le glucose est primordial pour la synthèse de GSH par l'intermédiaire de la L-sérine. En effet, comme décrit précédemment, la L-sérine est nécessaire pour la production de glycine (cycle folate) et de cystéine (voie de transsulfuration), tous deux composant le GSH (Figure I.23). De plus, la voie de transsulfuration permet la synthèse de GSH dans le cerveau en combinant la cystéine et la glycine (Figure I.24) **[230]** et participe donc à l'homéostasie rédox. Rappelons également que le cycle du folate, alimenté par la L-sérine, est également capable de régénérer le NADPH.

Des études récentes ont d'ailleurs montré que la biosynthèse de L-sérine est importante dans l'homéostasie des ROS dans la rétine **[231], [232]**. Les cellules de Müller (principales cellules gliales de la rétine) de la macula (zone de la rétine la plus dense en cônes) présentent des concentrations de L-sérine, GSH et ROS plus élevées que les autres cellules de Müller de la rétine. Perturber la synthèse de sérine dans l'œil entraîne une dérégulation de l'homéostasie des ROS plus importante dans la macula que dans le reste de la rétine. Les auteurs suggèrent ici qu'une dérégulation du PP puisse contribuer à la forte susceptibilité de la macula humaine à développer une cécité.

Enfin, les ROS peuvent influencer directement la production de L-sérine. En effet, un excès de ROS inhibe Keap1, ayant pour effet, comme décrit en section 4.2.2, d'activer la transcription des gènes-cibles de NRF2, incluant 200 gènes de la réponse anti-oxydante, dont les trois enzymes du PP **[36], [224]**. Une fois de plus, ces résultats corroborent l'importance de la L-sérine dans l'homéostasie cérébrale.

4.2.5. L-SERINE & EPIGENETIQUE

Le cycle de la méthionine permet la production de SAM, le donneur universel de groupe méthyle, nécessaire à la méthylation de l'ADN, de l'ARN ou des histones **[233]**. Leur méthylation, une des multiples marques épigénétiques, peut être effectuée à différents degrés par plusieurs méthyltransférases (Figure I.26).

La N-homocystéinylation des résidus lysine, bien que connue depuis les années 2000 **[234]**, a récemment été ajoutée comme marque épigénétique **[217]**. Elle correspond à l'ajout d'une thiol-homocystéine sur une protéine via l'acylation d'une lysine (Figure I.26). Une augmentation de cette marque épigénétique a d'ailleurs été liée à des troubles neuro-développementaux **[235]**.

Ces deux marques épigénétiques permettent la régulation de l'expression génique en modifiant la conformation de l'ADN[35], rendant ainsi accessibles, ou non, des séquences nucléotidiques pour leur transcription. La méthylation peut également survenir sur l'ARN messager, affectant alors sa propension à être traduit. Comme évoqué précédemment

[35] La modification de la conformation est soit directe, via l'apposition d'une marque épigénétique sur l'ADN, soit indirecte, via l'apposition d'une marque épigénétique sur les histones. Les histones sont les protéines formant les nucléosomes, autour desquels l'ADN est enroulé pour former la chromatine.

(Figures I.23 et I.24), le cycle de la méthionine dépend de la L-sérine pour la production de SAM et de l'homocystéine.

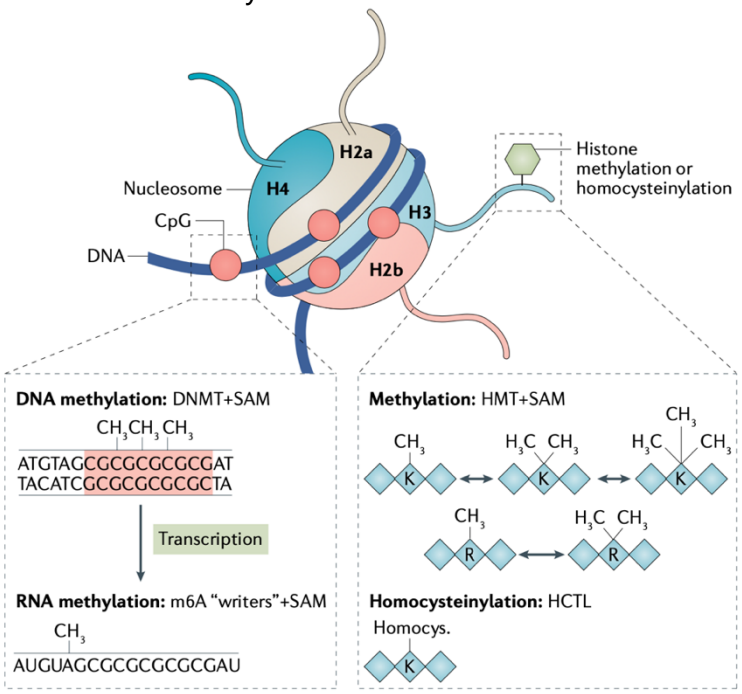


Figure I.26 – Les marques épigénétiques dépendantes de la méthionine et de la L-sérine [217]. Par la production de SAM, le cycle de la méthionine, alimenté par la L-sérine, est critique pour la dynamique de la chromatine. La chromatine est caractérisée par les unités structurelles que forment les nucléosomes, composés d'un octamère d'histones associé à l'ADN. Les histones et l'ADN peuvent être méthylés à différents degrés par des méthyltransférases. La composition et l'arrangement de ces méthylations forment des marques épigénétiques contribuant à l'expression des gènes. L'ARN peut également être méthylé, affectant ainsi la propension du messager à être traduit. Enfin, l'homocystéinylation des lysines a récemment été mise en évidence comme marque épigénétique. **CpG**, cytosine-phosphate-guanine ; **DNMT**, DNA méthyltransférase ; **HCTL**, homocystéine thiolactone ; **HMT**, histone méthyltransférase ; **Homocys.**, homocystéine.

L'utilisation d'isotopes radioactifs, de la spectrométrie de masse et la modulation de l'apport en nutriments dans des cellules cancéreuses a permis de mettre en évidence le rôle de de la L-sérine dans les processus de méthylation épigénétique, notamment à travers la production de la biomasse de précurseurs [236]. Cependant, aucune information n'est disponible à l'heure actuelle concernant les interactions entre le métabolisme de la L-sérine et l'épigénétique dans le cerveau. Il est néanmoins à noter que les mécanismes épigénétiques sont cruciaux pour l'homéostasie cérébrale et souvent dérégulés dans les maladies neurodégénératives [237].

4.3. Pathologies & Potentiel thérapeutique de la L-sérine

Les altérations de l'homéostasie de la L-sérine peuvent engendrer des pathologies ayant des répercussions sur le cerveau, ce qui n'est pas surprenant, au su de la place centrale de la L-sérine dans le métabolisme et la signalisation cellulaire. Les maladies génétiques liées au métabolisme de la L-sérine ont été décrites pour la première fois par Jaeken *et al.* en 1996 [238], [239] chez des patients atteints de troubles neurologiques dont les analyses du plasma et du LCR ont mis en évidence une diminution des concentrations en L-sérine. Les troubles neurologiques incluaient alors une microcéphalie, un retard psychomoteur et des convulsions. Une analyse génétique a révélé que ces symptômes étaient causés par des mutations dans les gènes codant pour la PHGDH ou la PSPH,

suggérant ainsi un rôle majeur de la synthèse *de novo* de L-sérine dans le développement et la physiologie du cerveau.

Le syndrome de Neu-Laxova a été décrit pour la première fois en 1971 [240], [241] et fut reconnu en 2014 comme étant la pathologie la plus sévère liée à un défaut de synthèse de L-sérine [242]. Cette pathologie rare et létale peut être causée par une mutation survenant dans n'importe quelle enzyme du PP [243]. Elle engendre des déformations du visage et de la peau, un développement du fœtus limité, des convulsions et une microcéphalie. Fort heureusement, ces pathologies peuvent être traitées par une supplémentation en L-sérine (500-700 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$) [244] si elles sont détectées suffisamment tôt*, id est*, avant la manifestation de dommages irréversibles au niveau du cerveau [245], [246]. Ces résultats suggèrent une fois de plus l'importance de la synthèse *de novo* de L-sérine pour le cerveau et confirment les bénéfices de sa supplémentation lorsque celle-ci voit sa synthèse diminuée.

En parallèle des maladies génétiques affectant la synthèse de L-sérine et engendrant des troubles neurologiques, sa supplémentation s'est également avérée bénéfique dans le cadre de pathologies sporadiques du cerveau. Les habitants de l'île de Guam (Micronésie, territoire non incorporé des USA) souffrent d'une maladie neurodégénérative endémique partageant certaines similitudes avec les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Charcot. Cette maladie est causée par la toxine β-N-méthylamino-L-alanine produite par une bactérie contaminant leur nourriture [247]. Il a été montré en culture cellulaire que l'apport de L-sérine exerce un effet neuro-protecteur contre cette toxine en entrant en compétition avec celle-ci pour leur incorporation dans les protéines [248], [249]. Chez des personnes âgées se plaignant de troubles de la mémoire, une étude a montré les effets bénéfiques d'un traitement à la phosphatidylsérine [250]. La L-sérine pourrait également jouer un rôle dans le vieillissement non pathologique. En effet, des études éthnobotaniques réalisées dans le village d'Ogimi au Japon suggèrent l'implication de la L-sérine dans le retardement du vieillissement (incluant celui du cerveau). Les habitants de ce village sont reconnus comme ayant une espérance de vie beaucoup plus longue que la moyenne japonaise, ce qui pourrait être expliqué par leur régime enrichi en algues, un régime bien plus enrichi en L-sérine que la moyenne de tous les autres régimes alimentaires connus [251].

Enfin, la L-sérine est actuellement en phase I d'essais cliniques pour le traitement de la neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type 1 [252] et pour la maladie de Charcot [253]. Ensemble, ces observations soulignent une fois de plus l'implication multiple de L-sérine dans la physiologie du cerveau et mettent en évidence sa potentialité à être utilisée comme traitement de nombreuses maladies du cerveau. Néanmoins, une meilleure compréhension de son métabolisme reste nécessaire pour déceler les contextes pathologiques dans lesquels elle pourrait s'avérer efficace.

Dans le cadre de notre étude menée sur le modèle murin 3xTg-AD, la L-sérine s'est avérée bénéfique [175]. Qu'elle soit ajoutée dans la chambre d'enregistrement durant les tests électrophysiologiques (Figure I.27-A) ou apportée par la nourriture en amont des tests (Figure I.27-B), elle a permis d'améliorer la LTP des souris 3xTg-AD au niveau des souris contrôles. Le régime enrichi en L-sérine s'est montré bénéfique également pour l'amélioration des capacités de mémoire spatiale des souris 3xTg-AD (voir Chapitre III section 3.3).

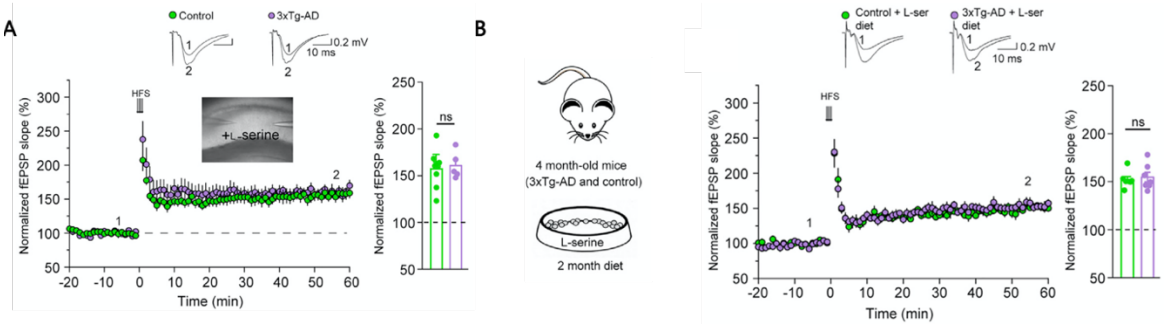


Figure I.27 – Amélioration des déficits synaptiques par la L-sérine, adaptée de [175]. A & B - Enregistrements électrophysiologiques au niveau de la synapse CA3-CA1 en présence de 50 µM de L-sérine dans la chambre d'enregistrement (**A**) ou après un régime enrichi à 10% en L-sérine pendant deux mois (**B**). Après stimulation à haute fréquence (HFS) les souris 3xTg-AD présentent une potentialisation synaptique identique à celle des souris contrôles.

En conclusion, la L-sérine est un acide aminé non essentiel mais central dans le métabolisme cellulaire. Dans le cerveau, elle participe à un grand nombre de fonctions incluant la neurotransmission, l'homéostasie, la morphologie et la prolifération cellulaires, la défense anti-oxydante et l'épigénétique. L'altération du métabolisme de la L-sérine durant le développement engendre d'importants troubles neurologiques à la fois chez la souris et l'être humain. La L-sérine est issue du métabolisme du glucose via le PP et est produite par les cellules gliales. L'existence d'une navette sérine entre astrocytes et neurones est vraisemblable mais doit encore être démontrée. Malgré tout cela, l'identification des mécanismes qui régulent sa biosynthèse, son éventuel stockage intracellulaire, sa distribution dans les différentes voies métaboliques et son transfert vers d'autres cellules restent encore à déterminer dans le cerveau, à la fois en conditions physiologiques, mais également pathologiques.

5. PROBLEMATIQUE

La maladie d'Alzheimer est caractérisée, entre autre, par une diminution très précoce du métabolisme du glucose dans certaines régions du cerveau, dont l'hippocampe, siège de la formation de la mémoire. L'utilisation du modèle murin 3xTg-AD a permis de mettre en avant une diminution de l'efficacité synaptique en lien avec une diminution de la disponibilité en D-sérine. **La supplémentation en L-sérine ayant montré des effets bénéfiques sur les troubles cognitifs et électrophysiologiques, nous proposons d'étudier les mécanismes pouvant rendre compte de ces bénéfices.**

Nous émettons l'hypothèse que les altérations du métabolisme du glucose observées de façon précoce dans la maladie d'Alzheimer peuvent engendrer un déficit de la biosynthèse de L-sérine dans les astrocytes. Cette diminution de la production de L-sérine dans l'hippocampe contribuerait aux symptômes cognitifs de la maladie d'Alzheimer. Nous avons montré qu'un défaut de libération de D-sérine permet de rendre compte d'une partie des effets observés. **Étant donné l'implication extrêmement large de la L-sérine dans le métabolisme cellulaire, nous supposons que la conversion de la L-sérine en D-sérine n'est pas le seul facteur expliquant les effets bénéfiques de la L-sérine.** En particulier, nous chercherons à déterminer si la L-sérine exerce son influence positive sur les interactions morphologiques synaptiques entre neurones et astrocytes.

Enfin, dans une optique thérapeutique, étant donné que (1) la supplémentation chronique en D-sérine n'est pas dénuée d'effets secondaires [254] et que (2) la supplémentation en L-sérine est sans effet secondaire, nous pourrions envisager l'utilisation de L-sérine comme potentiel traitement. Néanmoins, avant d'en arriver à ce stade, il est essentiel de comprendre le métabolisme de la L-sérine dans le cerveau et les mécanismes d'action lors de sa supplémentation dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Ce travail de recherche propose d'en poser les premiers jalons à travers quatre objectifs :

1. Déterminer précisément la localisation cellulaire de la biosynthèse de L-sérine dans le cerveau.
2. Étudier le phénotype astrocytaire du modèle murin de la maladie d'Alzheimer 3xTg-AD.
3. Évaluer les taux de L-sérine dans le cerveau de ce modèle.
4. Comprendre les effets et mécanismes d'action de la supplémentation en L-sérine dans ce modèle.

CHAPITRE II
MATERIELS & METHODES

MATERIELS & METHODES 63

1. ANIMAUX 65

1.1. ETHIQUE ET EXPÉRIMENTATION ANIMALE 65
1.2. HÉBERGEMENT ET RÉGIME ALIMENTAIRE 65
1.3. LES SOURIS 3XTG-AD, MODÈLES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 65

2. INFECTIONS VIRALES 66

2.1. DESIGN DES PLASMIDES 66
2.2. PRODUCTION DES VECTEURS VIRAUX AAV 67
2.3. INJECTIONS RETRO-ORBITAIRES 68

3. IMMUNOMARQUAGE FLUORESCENTS SUR TISSUS MURINS 69

3.1. PERFUSION ET FIXATION 69
3.2. IMMUNOMARQUAGES FLUORESCENTS 69
3.3. QUANTIFICATION DE LA FLUORESCENCE CELLULE PAR CELLULE ET ANALYSE DE LA DISTRIBUTION 70

4. IMMUNOMARQUAGES SUR TISSUS MURINS, MACAQUE ET HUMAINS 71

4.1. ORIGINE DES TISSUS 71
4.2. IMMUNOMARQUAGES AU VENTANA 72
4.3. MARQUAGE DE NISSL AU VIOLET DE CRÉSYL 73

5. ANALYSES MORPHOMÉTRIQUES DES ASTROCYTES ET NEURONES 74

5.1. PERFUSION, FIXATION ET MONTAGE DES COUPES 74
5.2. ACQUISITION HAUTE-RÉSOLUTION 74
5.3. RECONSTRUCTION 3D DES ASTROCYTES 74
5.4. ANALYSE DE LA RECONSTRUCTION 3D 75
5.5. ANALYSE DES NEURONES 76

6. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE 77

6.1. PERFUSION ET FIXATION 77
6.2. PRÉPARATION DES COUPES ET ACQUISITION DES IMAGES 77
6.3. QUANTIFICATION DE LA DENSITÉ SYNAPTIQUE 78
6.4. QUANTIFICATION ET RECONSTRUCTION 3D DE LA COUVERTURE ASTROCYTAIRE 79

7. CULTURES ET CO-CULTURES PRIMAIRES DE CELLULES MURINES 80

7.1. CULTURE PRIMAIRE D'ASTROCYTES 80
7.2. CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES 81
7.3. CO-CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES ET D'ASTROCYTES 82

8. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE 83

8.1. Extraction des ARN – Souris 83
8.2. Extraction des ARN – Culture primaire 83
8.3. Synthèse des ADN complémentaires 83
8.4. PCR quantitative en temps réel 84

9. Biochimie 85

9.1. Extraction des protéines – Souris 85
9.2. Extraction des protéines – Culture primaire 85
9.3. Extraction des protéines – Humains 85
9.4. Western-Blots 85
9.4.1. Western-Blot sur des dilutions sérielles de protéines 86
9.4.2. Western-Blot *stain-free* 87

10. Mesure des acides aminés *in vivo* 88

10.1. Chirurgie d'implantation du guide de microdialyse 88
10.2. Microdialyse 89
10.3. Chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) 90

11. Expérience de comportement : évaluation de la mémoire spatiale à long-terme par le test de la piscine de Morris 91

11.1. Habituation des animaux à l'expérimentateur 91
11.2. Apprentissage de la tâche 91
11.3. Test de mémoire à long-terme et analyse des données 92

12. Analyses statistiques 93

1. ANIMAUX

1.1. ETHIQUE ET EXPERIMENTATION ANIMALE

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été approuvées par le comité local d'éthique du CEA et soumises au Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (N° d'approbation 12-084, 14-015, APAFIS#617). Les expériences ont été conduites dans le respect de la législation française (Code rural et de la pêche maritime R214/87 à R214/130) et en accord avec les directives éthiques de l'Union Européenne (2010/63/UE) et de la Charte nationale française portant sur l'éthique de l'expérimentation animale.

1.2. HEBERGEMENT ET REGIME ALIMENTAIRE

Toutes les souris ont été générées dans les animaleries du laboratoire, accréditées par les autorités françaises compétentes (N° d'accréditation B9-032-02), et de statut sanitaire conventionnel. Les souris (2 à 5 individus) ont été hébergées dans des cages hermétiquement isolées (système de ventilation individuel) et contenant un enrichissement standard. La pièce d'hébergement est maintenue en permanence à une température de 22°C, à un taux d'humidité de 50% et suit un cycle jour/nuit de 12 h (lumières allumées à 7 h). Les souris ont eu accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture (croquettes Altromin 1310). Pour les expériences nécessitant une supplémentation en L-sérine, les souris ont suivi un régime enrichi en L-sérine pendant deux mois, à partir de l'âge de quatre mois (croquettes Altromin 1324 modifiées pour contenir 10% de L-sérine, voir chapitre V annexe 2 pour la composition exacte).

1.3. LES SOURIS 3XTG-AD, MODELES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Les expériences ont été conduites sur le modèle murin de la maladie d'Alzheimer 3xTg-AD, développé par le groupe de F. LaFerla en 2003 **[167]**. Nous avons utilisé des femelles[36] homozygotes (âgées de 4 à 18 mois) maintenues sur un fond génétique mixte J29/C57BL6 (JAX MMRRC Stock #034830). Ce modèle exprime le gène muté *PSEN1* M146V (*knock-in*) ainsi que les gènes humains mutés *APP* KM670/671NL (mutation *Swedish*) et *MAPT* P301L intégrés au même locus et sous contrôle du promoteur murin Thy1.2 (voir chapitre I section 3.3 pour une description complète du modèle). En guise de cohorte contrôle, nous avons généré des souris femelles non-transgéniques B6129SF2/J (JAX Stock #101045), de fond génétique similaire aux 3xTg-AD.

[36] Les femelles 3xTg-AD développent la pathologie plus rapidement que les mâles (voir chapitre I section 3.3.1).

2. INFECTIONS VIRALES

2.1. DESIGN DES PLASMIDES

Nos plasmides ont été synthétisés par la technique de clonage Gateway (Life Technologies) (Figure II.1). Les promoteurs et transgènes d'intérêt, flanqués de séquences attB, ont été produits par PCR puis intégrés dans des pDONR via recombinaison BP, selon le protocole du fournisseur. Les pENTR alors obtenus, portant soit le promoteur, soit le transgène, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine, ont été utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* DH10β par électroporation. Les bactéries ont ensuite été étalées sur boîte de Pétri (Life Technologies) contenant un milieu LB-agar-kanamycine, et permettant ainsi la sélection des clones transformés. Une colonie par boîte a été isolée et amplifiée dans un petit volume de LB-kanamycine. Les pENTR ainsi amplifiés ont pu être récupérés puis purifiés grâce au kit Monarch plasmid miniprep (NEB) et vérifiés par digestions enzymatiques spécifiques et séquençage.
Les séquences d'intérêt ont ensuite été transférées dans un pDEST, contenant les séquences ITR[37] ainsi que le gène de résistance à l'ampicilline, par recombinaison LR, selon le protocole du fournisseur. Les pAAV alors obtenus, portant le promoteur, le transgène, ainsi que le gène de résistance à l'ampicilline[38], ont été utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* DH10β par électroporation. Les bactéries ont ensuite été étalées sur boîte de Pétri contenant un milieu LB-agar-ampicilline, et permettant ainsi la sélection des clones transformés[39]. Une colonie par boîte a été isolée et amplifiée dans un petit volume de LB-ampicilline. Les pAAV ainsi amplifiés ont pu être récupérés puis purifiés grâce au kit Monarch plasmid miniprep et vérifiés par digestions enzymatiques spécifiques.

Les pAAV validés ont été amplifiés dans un grand volume de LB-ampicilline puis purifiés grâce au kit Nucleobond Xtra EF Maxiprep (Macherey-Nagel) pour la production des AAV.

[37] Les séquences ITR (*inverted terminal repeats*) sont de courtes séquences (145 pb) formant des structures palindromiques essentielles pour la réplication du génome viral et son encapsidation. Ce sont les seules séquences d'origine virale du plasmide.

[38] Les pAAV possèdent également des séquences régulatrices. Le promoteur est stabilisé par l'intron de la β-globine et le transgène est suivi d'une séquence de régulation post-transcriptionnelle WPRE (*Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element*), permettant d'augmenter son expression.

[39] Il y a ici une double sélection pour s'assurer que seules les bactéries transformées par le pAAV se développent sur la boîte de Pétri. Les bactéries transformées par les pENTR ne possèdent pas le gène de résistance à l'ampicilline et les bactéries transformées par le pDEST possèdent le gène RFA, entraînant le suicide de la bactérie.

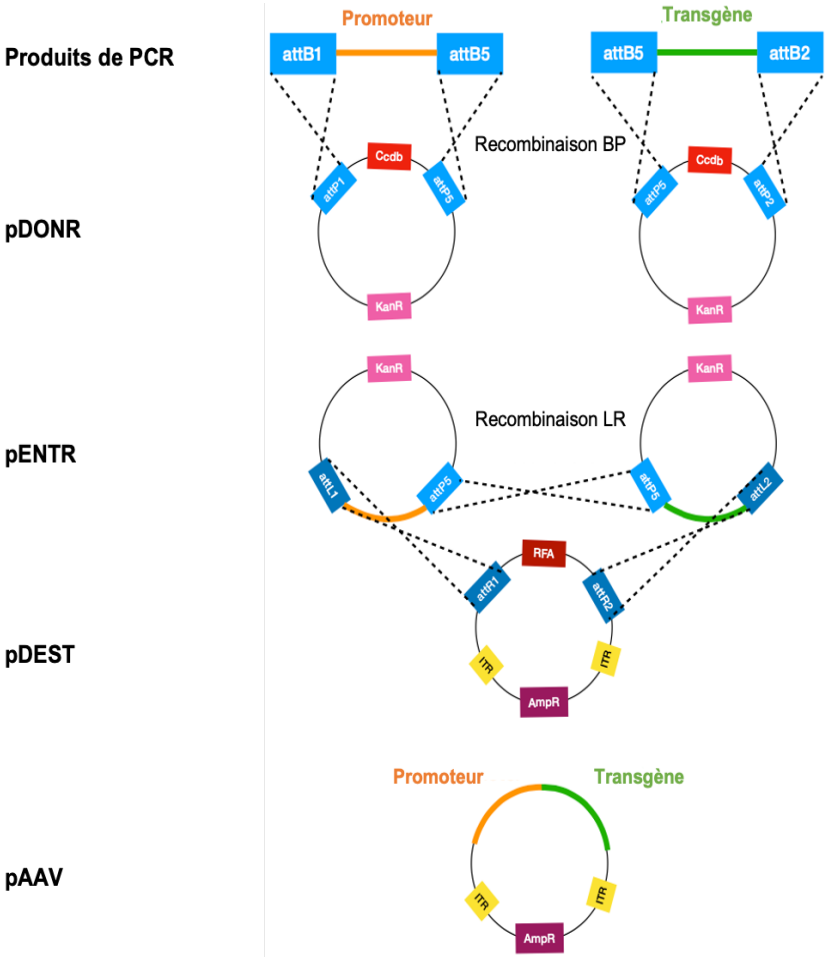


Figure II.1 – Stratégie de clonage Gateway par recombinaison *two-sites*, adaptée de [1]. Les produits de PCR sont insérés dans un plasmide pDONR via recombinaison BP. Les plasmides pENTR sont ensuite transférés dans un plasmide pDEST par recombinaison LR, formant ainsi un plasmide pAAV contenant le promoteur et le transgène.

2.2. PRODUCTION DES VECTEURS VIRAUX AAV

Les plasmides pAAV produits (voir Table II.1) ont été co-transfectés, par chlorure de calcium, dans des cellules HEK-293T à 70-90% de confluence, accompagnés d'un plasmide codant pour la capside du vecteur viral, ainsi qu'un plasmide *helper* (pXX6-80). Nous utilisons principalement la capside PHP.eB qui permet à l'AAV de traverser la BHE après injection intraveineuse. De plus, l'expression du transgène est 40 à 90 fois supérieure à une capside AAV2/9 (dans le cerveau, en fonction de la région étudiée) [255].

Table II.1 – pAAV produits et leur capside pour la production d'AAV.

Nom du plasmide	Promoteur	Transgène	Capside
GFA-GFP	GFA-abc1d[40]	GFP	PHP.eB
GFA-Tomato	GFA-abc1d	Td-Tomato	PHP.eB
CBA-GFP	CBA[41]	GFP	PHP.eB
CBA-Tomato	CBA	Td-Tomato	PHP.eB

[40] Le promoteur GFA-abc1d est une version raccourcie du promoteur endogène humain GFAP, permettant une expression accrue et spécifique du transgène dans les astrocytes [320].
[41] Le promoteur CBA permet une expression ubiquitaire du transgène dans le cerveau, avec une forte expression dans les neurones [321].

Afin de récolter les vecteurs viraux, à 72 h post-transfection les cellules ont été détachées de la plaque de culture et centrifugées 10 min à 1 500 rpm à 4°C. Le surnageant et le culot ont été récupérés.

Dans le surnageant, une solution de polyéthylène glycol à 5X (40% PEG, 2.5 M NaCl) a été ajoutée, puis le mixte a été laissé à 4°C pour 2 h, avant d'être centrifugé 20 min à 3 700×g à 4°C. Le culot a été mis de côté pour la suite du protocole.

Dans le premier culot récupéré, les cellules ont été lysées par l'ajout d'un tampon de lyse (NaCl 0.15 M, Tris-HCl 50 mM, pH=8.5) et par la réalisation de 3 cycles de congélation-décongélation (congélation : dans la carboglace ; décongélation : au bain-marie à 37°C). Le lysat ainsi obtenu a été ajouté au culot précédemment mis de côté.

Une solution de DNaseI (Roche, 20 mg.mL^{-1}, 1/200) et de $MgCl_2$ (1 M, 1/100) a été ajoutée au mixte précédent, avant de le laisser incuber 30 min à 37°C. Après incubation, le mixte a été centrifugé 20 min à 3 700×g à 4°C. Le surnageant a été récupéré et transféré dans des tubes d'ultracentrifugation, préalablement préparés pour contenir un gradient discontinu d'iodixanol *15%-25%-40%-60%* (Sigma). L'ultracentrifugation permettant la séparation zonale en gradient discontinu a été réalisée pendant 1.5 h à 59 000 rpm à température ambiante (TA).

La fraction AAV obtenue par ultracentrifugation a été purifiée à l'aide du kit Amicon Ultra-15 PL100 (Merck Millipore), selon le protocole du fournisseur. La solution finale ainsi obtenue contient les AAV dilués dans un volume défini par l'expérimentateur de PBS (*phosphate-buffered saline* 0.1 M) contenant 0.001% de Pluronic (Sigma). La concentration en particules virales a été déterminée par RT-qPCR (voir sections 8.4 pour plus de détails) ciblant les séquences ITR (voir Table II.10) et par comparaison avec une gamme étalon. Les titres ainsi obtenus sont exprimés en génomes viraux par millilitre (VG.mL^{-1}).

2.3. INJECTIONS RETRO-ORBITAIRES

Les souris ont été anesthésiées par inhalation continue d'isoflurane. Une seringue à insuline (aiguille 30 G), chargée de 50 µL de PBS-Pluronic contenant 10^{11} particules virales, a été utilisée pour atteindre le sinus rétro-orbitaire, et ainsi injecter les AAV dans le système sanguin.

3. IMMUNOMARQUAGE FLUORESCENTS SUR TISSUS MURINS

3.1. PERFUSION ET FIXATION

Les souris ont été euthanasiées par une injection létale de pentobarbital (Exagon) avant de recevoir une perfusion transcardiaque froide de fixateur (8 $mL.min^{-1}$ pendant 10 min), composé de 4% de paraformaldéhyde (PFA, Sigma), dans du PBS 0.1 M. Les cerveaux ont ensuite été récupérés et post-fixés durant la nuit dans la même solution de fixateur, avant d'être cryoprotégés dans une solution de sucrose (30% dans PBS 0.1 M) pour au moins 48h. Des coupes sagittales et coronales sérielles de 35 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées au microtome, avant d'être stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

3.2. IMMUNOMARQUAGES FLUORESCENTS

Pour les marquages PSAT1 uniquement, une première étape de pré-traitement acide fut nécessaire, afin de rendre l'antigène accessible à l'anticorps primaire. Les coupes ont été incubées dans une solution de citrate 10X (pH=6, Sigma) diluée dans de l'H_2O distillée, pendant 20 min au bain-marie à 80°C. Les coupes ont ensuite refroidi pendant 20 min à TA, avant d'être rincées trois fois dans une solution de PBS 0.1 M pendant 10 min. Après cette première étape, les coupes ont été traitées de la même manière que pour les autres marquages, selon le protocole ci-après.

Les coupes ont été perméabilisées et bloquées dans une solution de PBS 0.1 M contenant 0.2% de Triton X-100 (Sigma) et 4.5% de NGS (*natural goat serum*, Sigma) pendant 1 h. Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de PBS 0.1 M, 0.2% Triton X-100, 3% NGS contenant l'anticorps primaire (voir table II.2) pendant 36 h à 4°C. Après 3 rinçages de 10 min au PBS 0.1 M, les coupes ont été incubées dans une solution de PBS 0.1 M, 0.2% Triton X-100 contenant l'anticorps secondaire couplé à un Alexa-fluor (Invitrogen, 1/500) pendant 3 h à TA. Après 3 nouveaux rinçages de 10 min au PBS 0.1 M, les coupes ont été montées entre lame et lamelle #1.7 de verre, dans du Vectashield (H-1000, Vector, indice de réfraction=1.45) et immédiatement scellées avec du vernis à ongle transparent.

Cible de l'anticorps	Espèce	Référence fournisseur	Dilution
PHGDH	Lapin	Frontier, AB_2571653	1/1 000
PHGDH	Cochon d'inde	Frontier, AB_2571654	1/1 000
PSAT1	Lapin	Invitrogen, PA5-22124	1/1 000
GFAP	*Couplé à Cy3*	Sigma, C9205	1/5 000
OLIG2	*Couplé à Alexa 488*	Merck Millipore, AB9610-AF488	1/500
NEUN	Souris	Chemicon, MAB377	1/500
IBA1	Lapin	Wako, 019-19741	1/1 000

Table II.2 – **Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.** Les anticorps anti-GFAP et anti-OLIG2 sont déjà couplés à un anticorps secondaire. Lors de l'immunomarquage, il n'y a donc pas eu d'étape d'incubation avec un anticorps secondaire.

3.3. Quantification de la fluorescence cellule par cellule et analyse de la distribution

Les images ont été acquises au microscope confocal (Leica SP8). Les mêmes paramètres d'acquisition ont été répliqués pour toutes les images comparées entre elles. Une fois acquises, les images ont été déconvoluées à l'aide du logiciel AutoQuant X3 (Media cybernetics) et sauvegardées au format 8 bit. La quantification de la fluorescence a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji (NIH, [256]). Les images ont été binarisées, et les cellules marquées à la fois par les anticorps anti-GFAP et anti-PHGDH ont été encerclées sur l'image binaire. La valeur de gris moyen du marquage PHGDH de la cellule délimitée a été relevée sur l'image non binarisée. Les valeurs ont ensuite été réparties dans des *bins* de largeur 5 afin d'analyser leur distribution.

Afin d'illustrer la distribution des valeurs de gris moyen entre les différents groupes, les valeurs ont été réparties en trois catégories : fluorescence faible, fluorescence moyenne et fluorescence forte de la PHGDH. Ces trois catégories ont été définies sur l'ensemble des données obtenues pour les animaux contrôles afin de prendre en compte toutes les valeurs de fluorescence que peut prendre la PHGDH dans un même contexte expérimental et en conditions physiologiques. Le seuil fluorescence faible-expression moyenne correspond au centile 0.33 du jeu de données, et le seuil fluorescence moyenne-expression forte au centile 0.66.

4. IMMUNOMARQUAGES SUR TISSUS MURINS, MACAQUE ET HUMAINS

Les immunomarquages ont été réalisés sur des coupes de 4 µm d'épaisseur, incluses dans de la paraffine. Les marquages de Nissl ont été réalisés sur des coupes provenant des souris passées en microdialyse (voir section 10), pour vérifier les coordonnées d'insertion de la membrane de microdialyse dans le cerveau.

4.1. ORIGINE DES TISSUS

Des coupes, montées sur lame et incluses dans la paraffine, de souris et de macaque (*Macaca fascicularis*) nous ont été fournies par nos collaborateurs de la plateforme d'anatomopathologie du laboratoire. Des coupes histologiques humaines, incluant l'hippocampe, le gyrus parahippocampique et le gyrus fusiforme, de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (n=6 Contrôles, n=7 Alzheimer de stade Braak II-IV et n=8 Alzheimer de stade Braak VI) nous ont été fournies par la biobanque GIE-NeuroCeb, Paris (Les données démographiques des patients sont résumées en table II.3). La biobanque GIE-NeuroCeb [257] est en accord avec la législation française concernant la collecte de ressources biologiques et respecte le consentement du don et la protection des données personnelles (article L1243-4 du code de la Santé Publique). Le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation a accrédité cette structure pour la conservation d'échantillons humains et leur diffusion aux équipes de recherche (N° d'approbation CODECOH : AC-2018-3290).

Pour les marquages de Nissl, les souris passées en microdialyse ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Après une perfusion transcardiaque de 40 mL de NaCl 0.9% froid, le cerveau a été récupéré et congelé dans un bain d'isopentane. Les cerveaux ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Les cerveaux ont été inclus dans de l'OCT et des coupes de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées au Cryostat (Leica) à -20°C, avant d'être directement montées sur une lame, et gardées à TA jusqu'à utilisation.

Diagnostique	Cas	Genre	Âge (années)	PMD (heures)
Contrôles	1[&]	M	78	23
	2[&]	F	92	21
	3[&]	F	60	28
	4[&]	M	69	6
	5[&]	M	81	62
	6	F	53	29
Alzheimer de stade Braak II-IV	7[&]	M	70	31
	8[&]	F	76	28
	9[&]	M	81	34.5
	10[&]	F	73	21.5
	11	F	90	35
	12	F	92	33
	13	F	66	N/A
Alzheimer de stade Braak VI	14[&]	M	72	44
	15[&]	F	89	59
	16[&]	M	73	54
	17[&]	M	69	30
	18[&]	F	94	25
	19	M	68	34.5
	20	F	61	27
	21	M	8è	27

Table II.3 – **Données démographiques concernant les échantillons humains. PMD** : Délai post mortem ; **N/A** : Donnée non disponible ; **[&]** échantillon analysé en biochimie.

4.2. IMMUNOMARQUAGES AU VENTANA

Les immunomarquages sur coupes de souris, de macaques et humaines ont été réalisés à l'aide de l'automate Ventana Discovery XT (Roche Diagnostics), selon les instructions et à l'aide des consommables du fournisseur. Pour faciliter la première étape de déparaffinage, les coupes ont été préalablement placées dans une étuve à 56°C pendant 16 h. Une fois mises dans l'automate Ventana, les coupes ont été déparaffinées à l'aide de la solution EZprep pendant 30 min à 75°C. Les coupes ont ensuite été pré-traitées avec la solution RiboCC (PHGDH) ou CC1 (PSAT1) pendant 20 min à 95°C pour rendre l'antigène d'intérêt accessible à l'anticorps primaire. L'anticorps primaire anti-PHGDH ou anti-PSAT1 (voir table II.2) a été dilué dans la solution fournie Discovery Ab Diluent au 1/300 avant d'être manuellement appliqué sur les coupes. Les anticorps primaires ont été révélés à la DAB (3,3'-diaminobenzidine) et une contre-coloration à l'hématoxyline a été réalisée pendant 8 min. Les coupes ont ensuite été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (70% à pur) puis de xylène pur, avant d'être scellées.

Les lames ont par la suite été scannées à l'aide d'un scanner NanoZoomer Digital (Hamamatsu Photonics) sur la plateforme d'imagerie de l'Institut de la Vision, Paris.

4.3. MARQUAGE DE NISSL[42] AU VIOLET DE CRESYL

Les coupes obtenues au Cryostat ont suivi un protocole de déshydratation-réhydratation. Elles ont été plongées pendant 1 min dans des bains successifs d'éthanol (50% à pur) pour la déshydratation, puis en sens inverse (pur à 50%) en finissant par un bain d'eau (du robinet) pour la réhydratation. Le marquage de Nissl a été réalisé dans un bain de violet de Crésyl (0.1% acétate de violet de Crésyl, Sigma, dans de l'eau distillée) pendant 3 min. Les coupes ont ensuite été rincées à l'eau puis déshydratées selon le protocole décrit précédemment, en finissant par deux bains de xylène pur, avant d'être scellées.

[42] Le marquage de Nissl est une technique utilisée pour révéler la cytoarchitecture des tissus nerveux. Le violet de Crésyl révèle les corps cellulaires neuronaux en violet, en se fixant à l'ADN ou l'ARN.

5. ANALYSES MORPHOMETRIQUES DES ASTROCYTES ET NEURONES

5.1. PERFUSION, FIXATION ET MONTAGE DES COUPES

Les souris ont été euthanasiées par une injection létale de pentobarbital (Exagon) avant de recevoir une perfusion transcardiaque froide de fixateur (8 $mL.min^{-1}$ pendant 10 min), composé de 4% de PFA dans du PBS 0.1 M. Les cerveaux ont ensuite été récupérés et post-fixés durant la nuit dans le même fixateur, avant d'être rincés dans une solution de PBS 0.1 M à 4°C pendant au moins 24h.

Pour les analyses concernant les neurones, les cerveaux ont été coupés et scellés comme décrit en section 3.

Pour les reconstructions d'astrocytes, les hémisphères ont ensuite été séparés et inclus dans des blocs d'agar 2% (Sigma). Le bloc a été glué à la plateforme d'un vibratome (Leica VT1000 S), et des coupes de 100 µm d'épaisseur ont été réalisées. Les coupes ont été stockées dans une solution de PBS 0.1 M et 0.1% azide.

Les coupes ont été montées sur lame dans du Vectashield (H-1000, Vector) et scellées d'une lamelle #1.7 avec du vernis à ongles transparent. Elles ont ensuite été placées 24 h à 4°C, pour que le Vectashield puisse imprégner toute l'épaisseur de la coupe.

5.2. ACQUISITION HAUTE-RESOLUTION

Des *stacks* d'images ont été acquis au microscope confocal (Leica, SP8), avec des paramètres d'acquisition stricts et répétés pour toutes les acquisitions (voir table II.4). Les images ont été acquises dans la région CA1 de l'hippocampe. Une fois acquises, les images ont été déconvoluées à l'aide du logiciel AutoQuant X3 (Media cybernetics) et sauvegardées au format 8 bit.

Paramètres	Valeurs
Objectif	63X
Résolution	2048×2048 px
Vitesse d'acquisition	600 Hz
Espacement des images	0.26 µm
Nombre de moyennages par image	3
Intensité du laser	GFP=3% ; TdTomato=1%
Compensation du *bleaching*	*z-compensation via detector gain*
Vectashield	Indice de réfraction=1.45

Table II.4 – **Paramètres d'acquisition des images haute-résolutions d'astrocytes pour reconstruction 3D.** L'acquisition finale d'un astrocyte correspond en moyenne à la superposition de 180 à 320 images (*stack*), pour une taille de fichier d'environ 1 Go.

5.3. RECONSTRUCTION 3D DES ASTROCYTES

Les images ont d'abord été pré-traitées pour faciliter la reconstruction 3D. La brillance et le contraste ont été ajustés sur Fiji, selon les seuils prédéfinis par le logiciel, de sorte que l'astrocyte soit le plus visible possible. Puis, l'image a été importée dans le logiciel

Vaa3D (The Allen Institute, [258]) et un filtre anisotropique a été appliqué sur l'image. Ce filtre permet, par diffusion, de compléter les espaces entre les images du *stack* (images espacées de 0.26 µm), afin d'obtenir un astrocyte continu de bout en bout.

La reconstruction 3D a été réalisée à l'aide du *plug-in neuron-tracing*. Un marqueur est placé dans le soma de l'astrocyte, une valeur-seuil, permettant de faire la distinction entre astrocyte et bruit de fond, est définie, et la reconstruction se lance. A la fin, une étape de vérification est nécessaire, et un élagage de la reconstruction, par superposition avec l'image originale, est souvent à réaliser. Le fichier de la reconstruction a été enregistré au format .swc grâce au *plug-in sort neuron swc.*

La reconstruction générée ne tient pas compte de l'échelle de l'image, il a donc été nécessaire de procéder à une étape de recalibrage des valeurs. Le fichier .swc a été ouvert dans un éditeur de texte, et les valeurs x, y, z et r[43] ont été multipliées par les valeurs de la résolution de l'image (x, y et r=0.09014 ; z=0.26131) dans un fichier excel. Les nouvelles valeurs ont été insérées à la place des anciennes dans le fichier .swc.

5.4. Analyse de la reconstruction 3D

Une première analyse a été réalisée à l'aide du logiciel L-measure (Lm v5.3, George Mason University, [259]), qui permet une caractérisation quantitative des différents éléments de l'astrocyte (voir http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm pour le détail des éléments mesurables).

Nous nous sommes également intéressés au territoire total couvert par l'astrocyte. L-measure ne rendant pas compte de cette donnée, nous avons analysé la reconstruction à l'aide du logiciel Matlab (MathWorks). Pour pouvoir importer et traiter le fichier .swc dans Matlab, il a été nécessaire d'installer le *plug-in Trees* (Hermann Cuntz, [260]). Le territoire couvert par l'astrocyte a été modélisé par une analyse convex hull[44] (voir table II.5), aboutissant à un volume (µm^3) que nous avons pu comparer entre les différents groupes.

Commandes	Commentaires
Load_tree	Importer le fichier .swc
[K, V] = chull_tree	Modélisation convex hull
[Kv, Vv] = convhull(V.XYZ(:,1),V.XYZ(:,2),V.XYZ(:,3))	Modélisation convex hull
Vv	Affiche la valeur du volume
Vhull_tree	Affiche la modélisation

Table II.5 – Code Matlab pour la modélisation convex hull du territoire couvert par les astrocytes.

[43] x, y et z correspondent aux coordonnées dans l'espace des différentes structures reconstruites et r au rayon de ces structures.

[44] L'analyse convex hull permet de joindre toutes les extrémités de la cellule, afin de modéliser le volume total qu'elle couvre. Le volume couvert est différent du volume réel, puisqu'il prend en compte les espaces entre les prolongements astrocytaires, qui n'appartiennent pas à l'astrocyte *per se*, mais qui sont sous surveillance de ce dernier, et donc, appartiennent à son territoire.

5.5. ANALYSE DES NEURONES

Les neurones ont été analysés à l'aide du logiciel NeuronStudio (Icahn school of medicine [261]). Les boutons synaptiques ont été quantifiés manuellement le long des axones des neurones CA3 dans le *stratum radiatum* de CA1. Les épines dendritiques des neurones pyramidaux de CA1 ont été automatiquement détectées et classées selon leur morphologie, par le logiciel. Toutes ces données ont été normalisées par la longueur de la neurite, calculée par le logiciel, permettant ainsi d'obtenir la densité de l'élément mesuré.

6. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'acquisition des images de microscopie électronique (voir section 6.2) a été réalisée par nos collaborateurs de la plateforme BioEM de l'EPFL, à Lausanne, Suisse.

6.1. PERFUSION ET FIXATION

Les souris ont été euthanasiées par une injection létale de pentobarbital (Exagon) avant de recevoir une perfusion transcardiaque froide de 10 mL de PBS 0.1 M (8 $mL.min^{-1}$). Les souris ont ensuite reçu, de la même façon, 100 mL de fixateur froid, composé de 2% de PFA et 2.5% de glutaraldéhyde (Sigma), dans du PBS 0.1 M. Les animaux ont été laissés 1 h à TA, avant de récupérer les cerveaux et de les post-fixer dans le même fixateur pour la nuit. Les cerveaux ont été transférés dans du PBS 0.1 M avant d'être envoyés à Lausanne.

6.2. PREPARATION DES COUPES ET ACQUISITION DES IMAGES

Des coupes coronales de 80 µm d'épaisseur ont été réalisés au vibratome, avant d'être post-fixées une seconde fois et marquées dans différentes solutions[45]. Les coupes ont d'abord été plongées dans une solution de 1.5% de ferrocyanure de potassium et 2% d'osmium. Elles ont ensuite été marquées à l'aide d'une solution de thiocarbohydrazide à 1%, puis transférées dans une solution de tétroxide d'osmium à 2%. Enfin, les coupes ont passé la nuit dans une solution d'acétate d'uranyl à 1%, avant d'être rincées à l'eau distillée à 50°C, puis marquées au plomb dans de l'acide aspartique[46], à la même température. Finalement, les coupes ont été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol de plus en plus concentré, avant d'être incluses dans de la résine époxy Spurr [262] à faible viscosité. La résine a été solidifiée à 65°C pendant 24 h.

Les parties des coupes contenant la région CA1 de l'hippocampe ont été isolées du reste de la coupe à l'aide d'une lame de rasoir, puis placée dans le microscope électronique (Zeiss Merlin). Des séries de coupes ont été réalisées à l'aide de l'ultramicrotome dont est équipé le microscope électronique (Système 3View, Gatan) et une image a été capturée après chaque coupe (voir table II.6 pour les paramètres d'acquisition). 200 à 300 images ont été collectées par souris, puis alignées à l'aide du logiciel Fiji.

Paramètres	Valeurs
Tension du faisceau d'électrons	1.7 kV
Taille des pixels	6 nm
Temps d'éclairement *(dwell time)*	1 µs

Table II.6 – Paramètres d'acquisition des images de microscopie électronique.

[45] Ces étapes de post-fixation secondaires sont nécessaires pour contraster les tissus en introduisant des métaux lourds, ainsi que pour fixer les éléments peu sensibles aux aldéhydes du premier fixateur, comme les lipides.

[46] Le marquage au plomb en milieu acide permet une meilleure conservation de certains produits enzymatiques, qui se dissolvent à pH alcalin. La solution est composée de 0.02 M de nitrate de plomb et 0.03 M d'acide aspartique, ajustée au pH 5.5.

6.3. QUANTIFICATION DE LA DENSITE SYNAPTIQUE

L'analyse des images de microscopie électronique a été réalisée à l'aide du *plug-in TrakEM2* de Fiji. L'acquisition sérielle des images a permis de compter les synapses dans un volume représentatif et similaire pour chaque animal (environ 330 μm^3). Les synapses ont été discriminées selon leur morphologie en deux catégories, asymétriques (supposées excitatrices et glutamatergiques) ou symétriques (supposées inhibitrices et GABAergique) (Figure II.2). Un total de 1 067 synapses a été compté chez les 3xTg-AD et 1 094 chez les souris contrôles, permettant le calcul des densités synaptiques correspondantes (synapses.μm^{-3}).

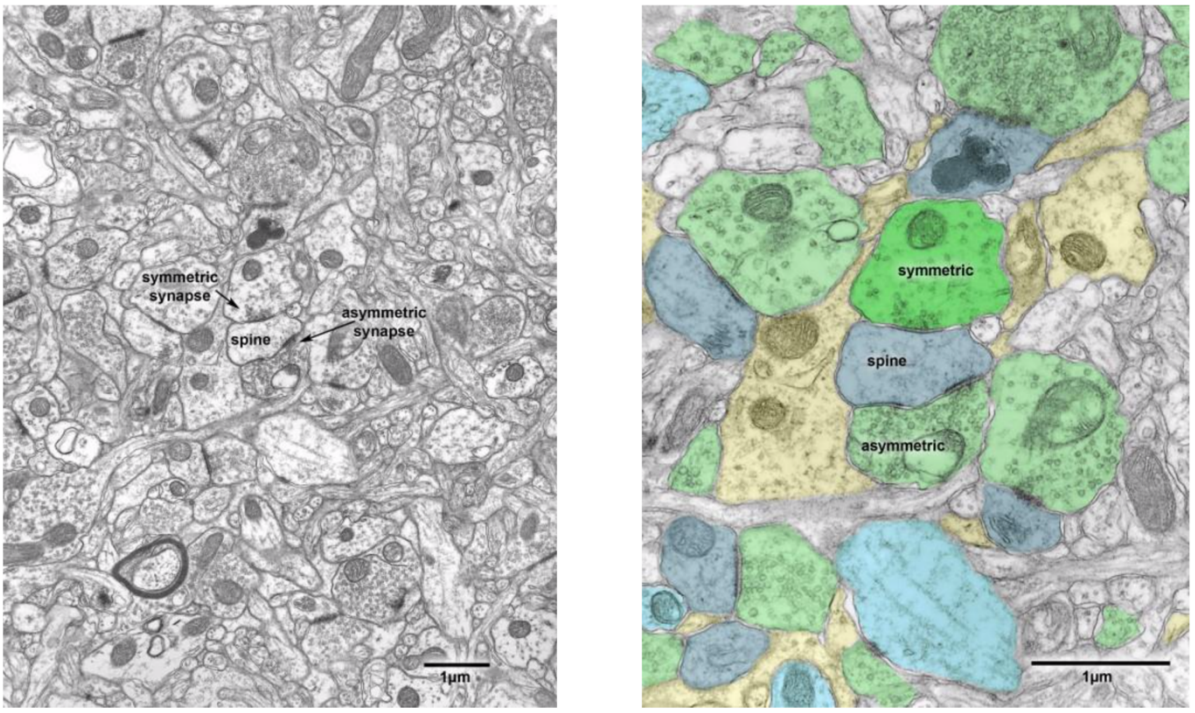


Figure II.2 – Classification des synapses selon leur morphologie, [263]. Les synapses asymétriques, présumées excitatrices, représentent environ 80% de toutes les synapses. Elles sont formées par une terminaison axonale contenant de nombreuses vésicules sphériques. La fente synaptique et la densité aux électrons post-synaptique sont larges. Les synapses symétriques, moins nombreuses et présumées inhibitrices, sont formées par la terminaison d'un axone contenant des vésicules pléiomorphes[47] et plus petites que celles des synapses asymétriques. La fente synaptique est étroite et la densité aux électrons post-synaptique aux est de taille similaire à celle pré-synaptique. Vert, terminaisons axonales ; Bleu, épines dendritiques ; Gris, dendrites ; Jaune, astrocytes.

[47] Qui possèdent la propriété de changer de forme sous certaines influences physiques.

6.4. Quantification et reconstruction 3D de la couverture astrocytaire

Les synapses ont été classées selon trois catégories, en fonction de leur(s) contact(s) avec les astrocytes (Figure II.2). La classe 1 correspond aux synapses n'ayant aucun contact avec un astrocyte, la classe 2 regroupe les synapses ayant un ou plusieurs contacts en dehors de la fente synaptique et la classe 3 comprend les synapses dont la fente synaptique est couverte par un pied astrocytaire. 150 synapses ont été classées par animal et un pourcentage pour chaque classe a été obtenu. La distribution de ces pourcentages en fonction des génotypes a ensuite été analysée.

Dans une optique d'illustration, les synapses ont été reconstruites en 3D à l'aide du logiciel Anatomist (BrainVisa).

7. Cultures et co-cultures primaires de cellules murines

Les expériences de culture primaire ont été menées dans l'équipe de Juan Pedro Bolaños, à l'Institut de Biologie fonctionnelle et Génomique de Salamanque, Espagne, lors d'un séjour de recherche de 3 mois de septembre à décembre 2019. Toutes les cultures ont été réalisées à partir de souris C57BL/6.

7.1. Culture primaire d'astrocytes

Pour chaque culture, huit souriceaux (P0 ou P1) ont été sacrifiés par décapitation en zone non stérile. Les têtes ont été plongées dans une solution de EBSS. Sous PSM, les cerveaux ont été extraits, puis le cervelet et les méninges retirés. Les cerveaux ont ensuite été transférés dans une solution d'EBSS contenant 1.4% de BSA (*bovine serum albumin*) et 1% de DNase[48], dans laquelle ils ont été finement découpés. Après décantation, la solution a été retirée et remplacée par 9 mL de la même solution, additionnée de 0.4% de Trypsine[49]. Le mixte a été incubé 10 min dans un bain-marie à 37°C. L'effet de la trypsine a ensuite été arrêté par l'ajout de 10% de sérum de vœu fœtal (SVF, Sigma). Le mixte a été centrifugé 5 min à 700×g à TA, afin de retirer le surnageant pour le remplacer par 12 mL de la première solution (sans trypsine). Les cellules contenues dans la solution ont été individualisées par 10 pipetages/refoulages lents, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et dont l'intérieur a été préalablement recouvert de silicone[50]. Le surnageant a été récupéré dans un falcon stérile, et l'opération répétée une nouvelle fois après l'ajout de 12 nouveaux mL de la première solution (sans trypsine). Puis le surnageant récupéré a été centrifugé pendant 5 min à 700×g à TA. Le culot cellulaire obtenu a été resuspendu dans 1 mL de milieu de culture *Dubelcco's modified eagle medium low glucose* (DMEM, Sigma D5546, glucose 5.5 mM) préalablement préparé (voir table II.7). Deux flasques de culture de 75 cm^2 ont été remplies de 39.5 mL de DMEM et ensemencées avec 0.5 mL des cellules précédemment resuspendues. Les flasques ont été doucement homogénéisées puis placées à l'incubateur (37°C, 5% CO_2) pour laisser les cellules se développer.

Produit	Concentration
DMEM	Selon besoin
SVF	10%
Glutamine	4 mM
Pénicilline	0.1 $U.mL^{-1}$
Streptomycine	0.1 $\mu g.mL^{-1}$
Amphotéricine	0.25 $ng.mL^{-1}$
Plasmocine	2.5 $\mu g.mL^{-1}$

Table II.7 – Préparation du milieu de culture DMEM pour culture primaire d'astrocytes. Toutes mentions de DMEM fait référence à ce mélange spécifique. Le DMEM est toujours chauffé au bain-marie à 37°C avant utilisation.

[48] La DNase permet de dégrader l'ADN libre, formant des *clusters* avec les morceaux de tissu et compliquant ainsi la dissociation des cellules.
[49] La trypsine permet la dissociation des cellules.
[50] Les cellules adhèrent au verre mais pas au silicone.

Les cultures ont ensuite été entretenues pendant deux semaines afin de sélectionner les astrocytes parmi toutes les espèces cellulaires et d'obtenir une densité de cellules matures suffisante pour les expériences (voir table II.8).

Jour[51]	Entretien	Commentaires
J+1	Renouvellement du DMEM	*Puis tous les deux jours*
J+7	Mise de la flasque sous agitation (180 rpm, 16 h)	Permet de détacher les microglies
J+8	*Seeding* dans plaques de culture 6 puits	100 000 cellules.cm^{-2}
J+15	Culture prête	

Table II.8 – Protocole d'entretien des cultures primaires d'astrocytes.

Une fois la culture prête, les ARN (voir section 8.2) ou les protéines (voir section 9.2) ont été extraits pour analyse.

7.2. CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES

Une souris enceinte depuis 15.5 jours a été sacrifiée par dislocation cervicale, afin de récupérer les embryons en zone non stérile. Les embryons ont été sortis de leur saccule, puis transférés dans une solution d'EBSS. Sous PSM, le même protocole que précédemment (voir section 7.1) a été réalisé afin d'obtenir un culot cellulaire resuspendu dans 1 mL.

A noter que les neurones sont cultivés dans du Neurobasal™-A (Sigma, #10888022) et non du DMEM (voir table II.9) et que le pipetage/refoulage doit être réalisé avec grande délicatesse, les progéniteurs neuronaux étant beaucoup plus fragiles que les astrocytes.

Produit	Concentration
Neurobasal™-A	Selon besoin
B-27 MAO[52]	2%
Glutamine	2 mM
Glucose	5.5 mM
Pyruvate	0.25 mM
Pénicilline	0.1 U.mL^{-1}
Streptomycine	0.1 µg.mL^{-1}
Amphotéricine	0.25 ng.mL^{-1}
Plasmocine	2.5 µg.mL^{-1}

Table II.9 – Préparation du milieu de culture Neurobasal™-A pour culture primaire de neurones. Toutes mentions de Neurobasal fait référence à ce mélange spécifique. Le Neurobasal est toujours chauffé au bain-marie à 37°C avant utilisation.

Les cellules resuspendues dans 1 mL de Neurobasal ont été comptées à l'aide d'une lame de Malassez, puis ensemencées dans des plaques 6 puits[53] à une densité de 200 000 cellules.cm^{-2}, avant d'être placées à l'incubateur pour laisser les cellules se développer (J0). Le milieu a été renouvelé une seule fois à J+1, et la culture décrétée prête à J+7. Une fois

[51] J0 correspond au premier jour de la culture, *i.e.* au jour du sacrifice des animaux.
[52] Minus antioxidant (MAO), *id est* sans vitamine E, acétate de vitamine E, superoxyde dismutase, catalase, glutathione (Life Technologies).
[53] Les puits de culture doivent préalablement être recouverts de poly-D-lysine pendant au moins 15 min à TA afin de faciliter l'adhérence des neurones.

la culture prête, les ARN (voir section 8.2) ou les protéines (voir section 9.2) ont été extraits pour analyse.

7.3. Co-culture primaire de neurones et d'astrocytes

Pour les co-cultures, il a été nécessaire d'utiliser des plaques de culture spécifiques[54], munies d'un insert semi-perméable, permettant au milieu d'être en contact à la fois avec les neurones (cultivées au fond du puits) et avec les astrocytes (cultivés dans l'insert, qui sera placé au-dessus des neurones). Les cultures précédemment décrites ont été commencées de sorte que le J+11 des astrocytes corresponde au J+3 des neurones.

A J0 des neurones, les neurones ont été ensemencés directement au fond des puits de la plaque Corning (préalablement recouverte de poly-D-lysine) dans du Neurobasal. Le milieu a été renouvelé à J+1.

A J+8 des astrocytes, les astrocytes ont été ensemencés dans les inserts, dans du Neurobasal. Le milieu a été renouvelé à J+9.

A J+11 des astrocytes et J+3 des neurones, le milieu a été renouvelé pour chaque culture, puis l'insert contenant les astrocytes a été placé au-dessus des neurones. Quatre jours plus tard (J+15 des astrocytes, J+7 des neurones), la co-culture est prête et les ARN (voir section 8.2) ou les protéines (voir section 9.2) ont été extraits pour analyse.

[54] *Polyester Transwell membrane inserts* de chez Corning, diamètre des pores de 0.4 µm

8. BIOLOGIE MOLECULAIRE

8.1. EXTRACTION DES ARN – SOURIS

Les souris ont été euthanasiées par une injection létale de pentobarbital (Exagon) et les hippocampes ont été récupérés par dissection. Chaque hippocampe (un par hémisphère) a été homogénéisé dans un tube contenant 500 µL de TRIzol (Life Sciences). Dans chaque tube, 100 µL de chloroforme (Merck Millipore) ont été ajoutés, avant de les centrifuger pendant 15 min à 12 000×g à 4°C. La phase aqueuse supérieure a été récupérée, et 2 µL de glycogène[55] (10 µg.µL^{-1}), ainsi que 250 µL d'isopropanol (VWR) y ont été ajoutés. Les mixtes ont ensuite été énergiquement mélangés à l'aide d'un vortex, avant de centrifuger les tubes durant 15 min à 12 000×g à 4°C. Le surnageant a été retiré, et 500 µL d'éthanol[56] (VWR) à 75% ont été ajoutés avant une nouvelle centrifugation de 5 min à 7 600×g à 4°C. Le surnageant a, à nouveau, été retiré et cette dernière étape a été répétée une seconde fois. Le culot d'ARN a finalement été resuspendu dans 20 µL d'eau *RNase-free* (Gibco) et la quantité d'ARN a été mesurée au spectrophotomètre Nanodrop (NanoDrop-One, Ozyme)

8.2. EXTRACTION DES ARN – CULTURE PRIMAIRE

Lorsque les cultures ont été prêtes, le milieu de culture a été retiré, et les cellules rincées au PBS 0.1 M. Puis, 500 µL de TRIzol ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été détachées mécaniquement à l'eau d'un râteau et le mixte récupéré dans un tube. Les ARN ont alors été extraits comme décrit dans la partie précédente (voir section 8.1).

8.3. SYNTHESE DES ADN COMPLEMENTAIRES

Les ARN extraits ont d'abord été traités à la DNase I (kit Promega) afin de dégrader l'ADN génomique contaminant. Pour ce faire, 1 µg d'ARN a été dilué dans 8 µL d'eau *RNase-free* (Gibco), dans lesquels ont été rajoutés 1 µL de DNase I Rq1 et 1 µL de solution tampon au 10X. Les échantillons ont été incubés 30 min à 37°C, puis la réaction a été arrêtée par l'ajout de 1 µL de solution stop et l'incubation des échantillons 10 min à 65°C. Les ARN sans ADN génomique ont alors été dilués à 25 ng.µL^{-1} par l'ajout de 29 µL d'une solution tampon de dilution (1/50 dithiothreitol (DTT, Invitrogen), 1/1 000 RNasin (Promega) dans du Tris-EDTA[57]).

Les ADN complémentaires (cDNA) de nos ARN ont été synthétisés à l'aide du kit Superscript Vilo (Life Technologies) selon les instructions du fournisseur. A noter qu'un échantillon d'ARN a été incubé sans enzyme afin de servir comme contrôle de la contamination en ADN génomique (échantillon nommé transcription réverse négative, RT-).

---

[55] Le glycogène permettra de teindre le culot d'ARN en blanc, afin de le visualiser après l'extraction.
[56] L'ajout d'éthanol permet de purifier et déshydrater les ARN.
[57] Tris-EDTA : 1/100 Trizma hydrochloride à 1 M, 1/500 EDTA à 0.5 M dans de l'eau *RNase-free*, pH ajusté à 7.6.

8.4. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) permet de quantifier les ARN messagers de plusieurs gènes définis par l'expérimentateur. Elles ont été réalisées à l'aide du kit iTaq Universal SYBR Green supermix (Bio-Rad). Pour chaque échantillon, 0.7 ng de cDNA a été incubé dans le mixte SYBR green, en présence des amorces spécifiques au gène étudié (3 pmol d'amorces *forward* et 3 pmol d'amorces *reverse,* voir table II.10).

L'amplification des cDNA a été réalisée au thermocycleur (Bio-Rad CFX384), selon le programme spécifique suivant :

- Activation de la Taq Platinium : 2 min à 95°C
- Fusion : 15 s à 95°C
- Élongation : 1 min à 60°C

} 40 cycles

- Dissociation : 60 min à 95°C

Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel CFX manager (Bio-Rad). Chaque échantillon a été réalisé en triplicat et leur moyenne a été considérée pour les analyses, si les valeurs obtenues présentaient moins de 5% de variabilité entre elles. L'eau utilisée pour les dilutions ainsi que la RT- ont également été analysées, pour s'assurer de l'absence de contamination. L'abondance des ARN messagers a été quantifiée par la méthode des ΔΔCt et normalisée par la valeur d'un gène de ménage (Cyclophiline A, Rpl13 et/ou Erp29).

Gène ciblé	Sens	Séquence 5' → 3'
Erp29	*Forward*	CCT TCC CTT GGA CAC AFT CAC T
Erp29	*Reverse*	GTC GAA CTT CAC CAA GAC GAA CTT
ITR	*Forward*	GGA ACC CCT AGT GAT GGA GTT
ITR	*Reverse*	CGG CCT CAG TGA GCG A
Phgdh	*Forward*	AAG TTC ATG GGG ACA GAG CTG AAC
Phgdh	*Reverse*	CCT TCA CCA TGT CCA ACT GGA
Psat1	*Forward*	GGG GTC ACG GTG ATT GTC
Psat1	*Reverse*	TGA TGG GCA CTC TCT GAG CGA
Psph	*Forward*	CGG AAC CGA GAA GAC CAG C
Psph	*Reverse*	GGA GAC CAT CCT GGG AAG TTT T
Rpl13	*Forward*	CTG AAG CCT ACC AGA AAG TTT GC
Rpl13	*Reverse*	GGT ACT TCC ACC CGA CC CAT
Sr	*Forward*	GTA GGA GGA GGA GGA ATG GTT
Sr	*Reverse*	TTC GGT GAC AGT GAA GAC ATC

Table II.10 – Amorces PCR pour la quantification des ARN messagers correspondants par RT-qPCR. Tous les couples d'amorces ont été précédemment validés par une RT-qPCR sur des dilutions sérielles de cDNA (0.004 ng à 14 ng). La linéarité du signal permet de quantifier l'efficacité des amorces. Toutes nos amorces ont une efficacité comprise entre 80% et 105%.

9. BIOCHIMIE

9.1. EXTRACTION DES PROTEINES – SOURIS

Les souris ont été euthanasiées par une injection létale de pentobarbital (Exagon) et les hippocampes ont été récupérés par dissection. Chaque hippocampe (un par hémisphère) a été pesé puis 10 µL.mg^{-1} de tampon de lyse, préalablement préparé[58], a été ajouté.

Les échantillons ont ensuite été soniqués[59] 5 fois dans la glace afin d'obtenir un homogénat. Ces homogénats ont alors été centrifugés pendant 20 min à 16 000×g à 4°C, et le surnageant, contenant les protéines, a été conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

9.2. EXTRACTION DES PROTEINES – CULTURE PRIMAIRE

Lorsque les cultures ont été prêtes, le milieu de culture a été retiré, et les cellules rincées au PBS 0.1 M. Puis, 150 µL de tampon de lyse ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été détachées mécaniquement à l'aide d'un râteau et le mixte récupéré dans un tube. Les protéines ont alors été extraites comme décrit dans la partie précédente (voir section 9.1).

9.3. EXTRACTION DES PROTEINES – HUMAINS

La biobanque GIE-NeuroCEB (voir section 4.1) nous a également fourni des échantillons de cerveaux humains, congelés en copaux. Ces échantillons, comme pour les coupes histologiques, incluent l'hippocampe, le gyrus parahippocampique et le gyrus fusiforme, de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (n=5 par groupes ; Contrôles ; Alzheimer de stade Braak II-IV et Alzheimer de stade Braak VI). Les données démographiques concernant les patients sont résumées dans la table II.3.

Les échantillons ont été pesés, puis les homogénats et l'extraction des protéines ont été réalisés de la même façon que décrite précédemment (voir section 9.1).

9.4. WESTERN-BLOTS

Les quantités de protéines extraites précédemment ont été mesurées à l'aide du kit BCA Pierce (Thermo Fischer Scientific), selon les instructions du fournisseur.

[58] Tampon de lyse : Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl, 1% SDS, pH ajusté à 7.4, dans lesquels deux pastilles d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases (Roche) ont été dissoutes. Le même tampon de lyse a été utilisé pour toutes les extractions de protéines.

[59] Amplitude 30%, cycle 0.5.

9.4.1. WESTERN-BLOT SUR DES DILUTIONS SERIELLES DE PROTEINES

Les quantités de protéines obtenues à partir de tissus murins et humains nous ont permis de réaliser des dilutions sérielles pour la quantification en western-blot. Cette technique permet de s'affranchir d'un gène de ménage[60], mais également de vérifier que notre protocole expérimental conduit bien à une réponse linéaire du signal, en fonction de la quantité de protéines chargée. La précédente doctorante de notre équipe, Marianne MAUGARD, a donc défini un protocole de western-blot basé sur 4 dilutions sérielles par échantillons (2.5 $\mu g.\mu L^{-1}$, 2 $\mu g.\mu L^{-1}$, 1.5 $\mu g.\mu L^{-1}$, 1 $\mu g.\mu L^{-1}$), permettant ainsi la quantification précise d'une protéine, parmi toutes celles présentes dans cet échantillon [1]. Cette technique a déjà fait l'objet de plusieurs publications par d'autres équipes [264]–[266].

Les dilutions ont été réalisées dans le tampon de lyse de façon à obtenir des tubes contenant 25, 15, 10 et 5 µg de protéines par échantillons. Les protéines ont ensuite été dénaturées à 90°C pendant 10 min, après l'ajout d'agent réducteur NuPage 10X et de tampon LDS NuPage 4X (Invitrogen). Les échantillons dénaturés ont ensuite été chargés sur un gel Criterion TGX Stain-free 4-20% (Bio-Rad), les protéines ont été séparées par électrophorèse, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du système de transfert TransBlot Turbo Transfer (Bio-Rad).

La membrane a ensuite été bloquée dans une solution de TBS (*tris-buffered saline* 0.1 M) contenant 0.1% de Tween 20 et 5% de BSA, pendant 1 h à TA, sous agitation. Puis la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire (voir table II.11) pendant 16 h, dans la même solution de blocage. Après trois rinçages au TBS, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire fluorescent anti-lapin infrarouge 700 (1/5 000, Li-Cor), dans la même solution de blocage, pendant 3 h. Après rinçages, la fluorescence a été détectée à l'aide du système d'imagerie Odyssey CLX (Li-Cor).

La quantification de la fluorescence a été réalisée à l'aide du logiciel Image Studio 5.2 (Li-Cor). Chaque bande a été manuellement délimitée et son intensité de fluorescence quantifiée par le logiciel. Les 4 dilutions par échantillons ont permis de déterminer la pente pour chaque échantillon par régression linéaire. Les données sont présentées sous forme de moyenne des pentes pour chaque groupe.

Cible de l'anticorps	Espèce	Référence fournisseur	Dilution
ACTINE	Lapin	Sigma, A2066	1/5 000
PHGDH	Lapin	Frontier, AB_2571653	1/10 000
PSAT1	Lapin	Invitrogen, PA5-22124	1/2 000

Table II.11 – Liste des anticorps primaires utilisés pour les western-blots.

[60] La normalisation par un gène de ménage est source d'erreurs lors de la quantification.

9.4.2. WESTERN-BLOT *STAIN-FREE*

Les quantités de protéines obtenues à partir des cultures cellulaires n'ont pas été suffisantes pour nous permettre de réaliser des dilutions sérielles. Afin de toujours s'affranchir de l'utilisation d'un gène de ménage nous avons opté pour la normalisation de nos données par la quantité totale de protéines présentes dans l'échantillon (western-blot *stain-free*).

Au lieu d'une dilution sérielle, 5 µg de protéines par échantillons ont été chargés dans le gel. Après migration des protéines, le gel a été placé 5 min aux UV (ChemiDoc XRS+ accompagné du logiciel Image Lab, Bio-Rad), puis le transfert a été réalisé sur membrane de nitrocellulose. La membrane a, à son tour, été placée aux UV en *auto-exposure*, afin d'obtenir une image de toutes les protéines contenues sur la membrane[61]. Cette image a été sauvegardée pour servir de normalisateur lors de la quantification. La suite du protocole a été réalisée de la même façon que décrite précédemment (voir section 9.4.1).

Pour la quantification, la valeur d'intensité de fluorescence donnée par le logiciel Image Studio a été normalisée par la valeur de gris moyen donnée par le logiciel Image Lab. Les données sont présentées sous forme de moyenne des ratios pour chaque groupe.

[61] Les UV permettent d'activer les tryptophanes contenus dans les protéines, et ainsi de révéler toutes les protéines présentes. Une mesure du niveau de gris moyen rend compte de la quantité totale relative de protéines dans chaque échantillon.

10. MESURE DES ACIDES AMINES *IN VIVO*

Pour évaluer la concentration en différents acides aminés (L-sérine, D-sérine, et Glutamate) dans l'hippocampe des souris, nous avons collecté le milieu extracellulaire par microdialyse durant 24 h (Figure II.3), puis analysé sa composition par LC-MS/MS (chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem). Les microdialyses ont été réalisées sur animaux vigiles, afin d'éviter toutes perturbations potentiellement dues aux anesthésiants et analgésiques.

Avant toutes procédures, les souris ont été habituées au *set-up* de microdialyse en plaçant les animaux dans le bol d'hébergement (STANK/WF, Instechlabs) 15 min par jours, pendant 3 jours. Elles ont également été habituées au Solid Drink® (Genobios), généralement donnés aux souris en post-opératoire pour faciliter leur hydratation, afin de limiter une potentielle néophobie développée à cause d'une chirurgie traumatisante.

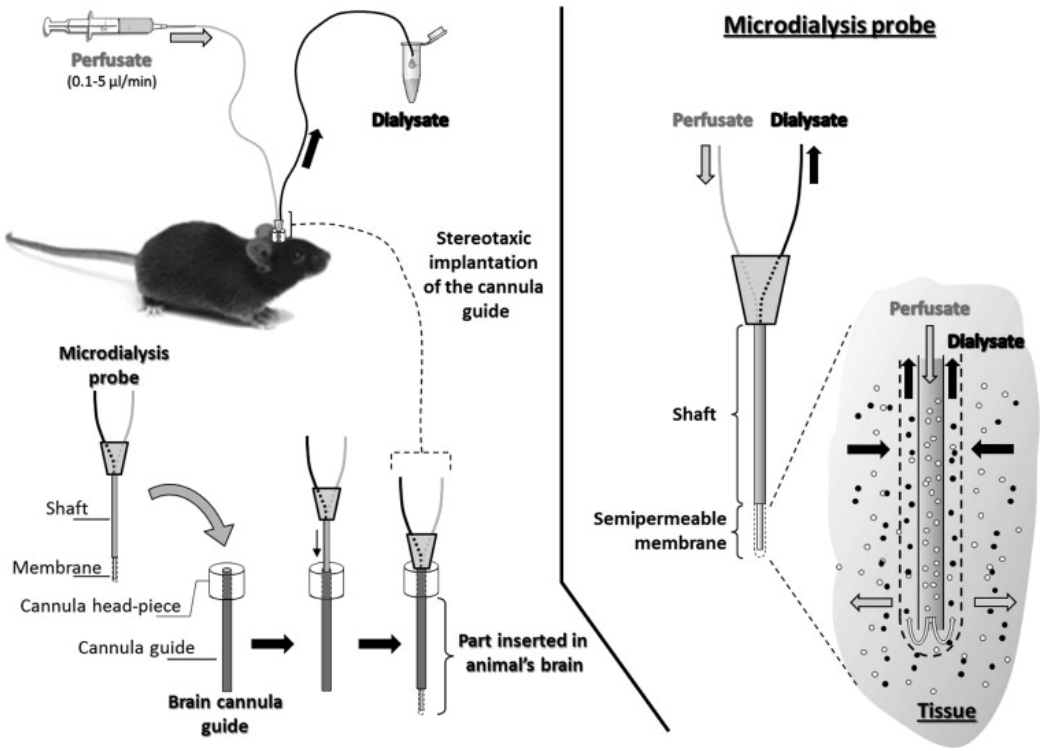


Figure II.3 – Schéma explicatif de la microdialyse, [267]. Le guide d'implantation de la membrane est placé lors d'une chirurgie de façon à ce que la membrane puisse atteindre la région d'intérêt à microdialyser. Lors de l'expérience, la membrane de microdialyse est descendue le long du guide et perfusée d'aCSF (*artificial cerebrospinal fluid*). Un échange osmotique se met en place au niveau de la membrane afin d'équilibrer les concentrations entre aCSF et milieu extracellulaire microdialysé. L'analyse ultérieure du microdialysat permet d'extrapoler la composition du milieu extracellulaire microdialysé.

10.1. CHIRURGIE D'IMPLANTATION DU GUIDE DE MICRODIALYSE

Afin de dialyser le milieu extracellulaire, il a d'abord été nécessaire de placer un guide d'insertion de la membrane de microdialyse dans le cerveau des souris. Ce guide est

placé de façon à ce que la membrane de microdialyse atteigne la région d'intérêt (Figure II.3).

Les souris ont été analgésiées par une injection sous-cutanée pré-opératoire de buprénorphine (0.05 $mg.kg^{-1}$, Vétergésic). L'anesthésie profonde a ensuite été atteinte par une injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine (100 $mg.kg^{-1}$) et xylazine (10 $mg.kg^{-1}$). Une anesthésie locale a également été appliquée par l'injection de 50 µL de lidocaïne 0.5% (Xylovet), en sous-cutanée, au niveau du crâne. Une hydratation préventive a également été réalisée par l'injection sous-cutanée de 300 µL de NaCl 0.9% à 37°C. Durant toute la procédure, la température de l'animal a été monitorée et maintenue à 37°C.

Les souris ont été fixées sur un cadre de stéréotaxie. La tête a été nettoyée à la bétadine savon (50% diluée dans de l'eau PPI) puis à la bétadine solution. Le crâne a ensuite été découvert à l'aide d'un scalpel stérile et nettoyé. Le guide a été positionné au niveau du Bregma. Pour atteindre la région CA1 de l'hippocampe, le guide a été déplacé selon les coordonnées décrites en table II.12. Aux coordonnées définies, le crâne a été foré pour atteindre la dure mère, à partir de laquelle le guide a été descendu pour atteindre la région d'intérêt (voir table II.12). Le guide a ensuite été maintenu en place par un ciment dentaire photo-polymérisé aux UV (Tetric EvoFlow, Megadental). Pour que le ciment dentaire adhère correctement au crâne, celui-ci été préalablement recouvert d'un agent adhésif (OptiBond FL, Dentaltix). La peau du crâne a ensuite été recousue à l'aide d'un fil de soie 6.0, autour du chapeau en ciment dentaire. Les souris ont alors été laissées en rémission durant 5 jours avant de procéder à la microdialyse.

Direction	Référence	Coordonnées
Antéro-postérieure	Bregma	- 2 mm
Latérale	Bregma	+2 mm
Ventrale	Dure-mère	- 1 mm

Table II.12 – **Coordonnées des sites d'implantation du guide de microdialyse.** A noter que la membrane de microdialyse dépasse de 1 mm du guide, permettant ainsi d'atteindre la région d'intérêt.

10.2. MICRODIALYSE

Pré- et post-microdialyse, la membrane de microdialyse a été plongée dans une solution de calibrage, composée des acides aminés recherchés, à concentration extracellulaire physiologique théorique (10 µM L-sérine, 2 µM D-sérine, 10 µM Glycine, 100 µM Glutamate, 1 mM Lactate). Le dosage des dialysats de calibrage permet de définir le rendement de la membrane. Les concentrations extracellulaires finales en acides aminés ont été obtenues par extrapolation des valeurs mesurées à l'aide de la valeur de rendement.

Pour tous les animaux, les microdialyses ont commencé aux alentours de 13 h. La souris a été endormie par inhalation d'isoflurane, afin de pouvoir descendre la membrane de microdialyse (CMA 7, 1 mm cuprophane (6 kD), CMA P000082) dans le guide. La membrane a été continuellement irriguée par un flux constant (1 $µL.min^{-1}$) d'aCSF (*artificial cerebrospinal fluid*, 147 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.2 mM$CaCl_2$, 0.85 mM $MgCl_2$, Perfusion

fluid CNS sterile, CMA) durant 24 h[62] (Figure II.3). Les dialysats ont été collectés toutes les heures à l'aide d'un collecteur de fractions réfrigéré (MAB85, Microbiotech), puis congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

La position de la membrane de microdialyse a été vérifiée par un marquage de Nissl (voir section 4.3) à la fin de l'expérience.

10.3. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ET SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM (LC-MS/MS)

La détermination simultanée des concentrations extracellulaires en L-sérine, D-sérine et L-glutamate a été réalisée par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) [268] par nos collaborateurs de la plateforme SMArt-MS du CEA. Le système LC-MS/MS est composé d'un appareil UPLC (*ultra-high performance liquid chromatography*) Acquity I-CLASS et d'un spectromètre de masse triple quadripôle Xevo-TQ-XS (Waters SAS). La séparation chromatographique chirale a été réalisée à l'aide d'une colonne CROWNPAK CR-I(+) (5 mm, 3 mmID, 150 mm, Daicel Corporation) à une température oscillant entre 0 et +1°C. La phase mobile était composée d'acide trifluoroacétique à 0.3% dans une solution d'acétonitrile à 10% et maintenue à un flux constant de 0.15 $mL.min^{-1}$, permettant ainsi une élution isocratique[63].

Les échantillons ont été dilués dans la phase mobile (1/2) et 10 mL ont été injectés dans le système LC-MS/MS. Dans ces conditions, les temps de rétention sont de respectivement 4.60, 4.82 et 11.00 min pour la D-sérine, la L-sérine et le L-glutamate.

La spectrométrie de masse en tandem a été réalisée en mode MRM (*multiple reaction monitoring*) permettant la quantification des molécules préalablement séparées.

[62] La membrane étant permissive aux molécules de taille inférieure ou égale à 6 kD, un équilibre osmotique se met en place au niveau de la membrane entre le milieu extracellulaire (où la membrane est placée) et l'aCSF (irriguant la membrane). Le dialysat récupéré correspond donc à de l'aCSF, dans lequel ont diffusé les molécules (<6 kD) présentes dans le milieu extracellulaire du cerveau, selon un ratio propre à chaque molécule et déterminé par la valeur de rendement.

[63] L'élution isocratique (phase mobile de composition et paramètres identiques tout au long de l'expérience) est préférée à l'élution en gradient lorsqu'il s'agit de séparer des énantiomères.

11. EXPERIENCE DE COMPORTEMENT : EVALUATION DE LA MEMOIRE SPATIALE A LONG-TERME PAR LE TEST DE LA PISCINE DE MORRIS

L'expérience de la piscine de Morris vise à tester les capacités de mémoire spatiale à long-terme des animaux. Les souris sont entraînées à retrouver une plateforme immergée dans une piscine à partir d'indices visuels placés sur les murs (rond, triangle et carré noirs). Une fois la localisation apprise, leur mémoire à long-terme est testée 72 h plus tard.

La piscine correspond à un réservoir circulaire de 150 cm de diamètre, rempli d'eau et de peinture blanche pour la rendre opaque. La température de l'eau est maintenue à 24°C et la luminosité de la pièce à 430 lux. Tous les déplacements des souris sont enregistrés et analysés par le logiciel de suivi vidéo Ethovision XT 13 © (Noldus).

11.1. HABITUATION DES ANIMAUX A L'EXPERIMENTATEUR

Avant toutes expériences de comportement, les souris ont été habituées à l'expérimentateur. Durant 5 jours, chaque souris a été manipulée pendant 2 min. Pour toute la durée de l'expérience, le change des cages a également été réalisé par l'expérimentateur.

11.2. APPRENTISSAGE DE LA TACHE

L'apprentissage s'est étalé sur 6 jours. Le but du premier jour est d'apprendre aux souris l'existence d'une plateforme dans la piscine. Pour ce faire, les indices visuels n'ont pas été mis en place et la plateforme n'a pas été immergée. Un objet de couleurs vives a été placé sur la plateforme pour aider les souris à la visualiser. Chaque souris a réalisé 4 essais, espacés de 30 min. La localisation de la plateforme, ainsi que le point d'entrée dans la piscine ont été changés pour chaque essai. Si une souris n'a pas trouvé la plateforme au bout d'une minute de nage, l'expérimentateur la guide vers celle-ci et la laisse s'y reposer pendant 30 s, avant de la récupérer.

Les 5 jours suivants, la localisation de la plateforme est fixe dans la piscine, et les indices visuels sont placés au mur[64]. Les souris ont réalisé 3 essais par jours, espacés de 30 min. Le point d'entrée dans la piscine a été changé pour chaque passage[65]. Si une souris n'a pas trouvé la plateforme au bout d'une minute de nage, l'expérimentateur la guide vers celle-ci et la laisse s'y reposer pendant 30 s, avant de la récupérer. L'analyse du temps de latence[66] au fil des jours permet de s'assurer que les souris apprennent. Les souris n'ayant pas appris la localisation de la plateforme à la fin de l'apprentissage ont été exclues lors de l'analyse (critères d'exclusion : cumul des temps de latence > 620 s ; nombre de réussites < 9).

---

[64] Un triangle noir est placé en face de la plateforme.

[65] Changer le point d'entrée permet de s'assurer que les souris apprennent la localisation de la plateforme à l'aide des indices visuels, plutôt que de mémoriser le chemin le plus court pour l'atteindre.

[66] Le temps de latence correspond au temps nécessaire à la souris pour trouver la plateforme et y rester au moins 3 s.

11.3. TEST DE MEMOIRE A LONG-TERME ET ANALYSE DES DONNEES

Le test de mémoire à long-terme a été réalisé 72 h après le dernier jour d'apprentissage. Pour cette phase de l'expérience, la plateforme est retirée de la piscine et les souris sont libres de nager dans la piscine pendant 1 min, un seul passage par souris. Les déplacements de la souris ont été suivis et enregistrés. La piscine a été numériquement divisée en 4 cadrans, dont un dans lequel se trouvait la plateforme (dit cadran cible). Le temps passé dans chaque cadran par les souris a été calculé. Si une souris a passé significativement plus de 25% de son temps dans le cadran cible, alors il est estimé qu'elle s'est souvenue de la localisation de la plateforme et qu'elle ne présente donc pas de déficits cognitifs relatifs à la mémoire spatiale.

12. ANALYSES STATISTIQUES

Aucune méthode statistique n'a été utilisée pour déterminer la taille des échantillons. Pour chaque analyse, la normalité des résidus ainsi que l'homoscédasticité des variances ont été évaluées afin de déterminer le type de test statistique à réaliser (paramétrique ou non-paramétrique). Les données sont présentées sous la forme moyenne ± SEM. Une p-value inférieure à 0.05 est considérée statistiquement significative.

Les analyses statistiques et la génération des figures ont été réalisées à l'aide des logiciels Prism 8 (GraphPad) et R (R Core Team). Les tests statistiques utilisés sont résumés en table II.13. R a été utilisé pour les régressions linéaires (package nlme de R) selon la méthode définie par la précédente doctorante de notre équipe, Marianne MAUGARD [1].

Jeu de données	Analyse statistique	Post-hoc
Fluorescence PHGDH	χ^2, Nested t-test, Nested 1-way ANOVA[67]	
Morphologie des astrocytes	Nested 1-way ANOVA	
Éléments pré- et post-synaptiques	Nested 1-way ANOVA	
Densités synaptiques	Unpaired multiple t-tests	
Couverture astrocytaire	Unpaired multiple t-tests, χ^2	
qPCR	2-way ANOVA	Tukey's
Western-blot *stain-free*	2-way ANOVA	Tukey's
Western-Blot en gamme	Régression linéaire à effets multiples	
Microdialyse	ANOVA sur mesures répétées	
Piscine de Morris	t-test contre 25%	

Table II.13 – **Liste des expériences et des tests statistiques utilisés lors de leur analyse.**

[67] Le *nested model* prend en compte le fait d'avoir un grand nombre de cellules, provenant d'un petit nombre d'animaux. Ce modèle suppose que toutes les observations faites pour un groupe sont dépendantes du facteur animal. Il peut être de type t-test (2 groupes) ou 1-way ANOVA (>2 groupes).

CHAPITRE III
RESULTATS

RESULTATS 95

1. LOCALISATION CELLULAIRE DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE LA L-SÉRINE 97

1.1. LE PP EST EXPRIMÉ PAR LES ASTROCYTES *IN VITRO* 97
1.2. L'EXPRESSION DES ENZYMES DU PP EST PRINCIPALEMENT GLIALE 98

2. LE PP DANS LE CONTEXTE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 102

2.1. LE PP EST ALTÉRÉ CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 102
2.2. L'EXPRESSION TOTALE DE LA PHGDH N'EST PAS ALTÉRÉE DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS 3XTG-AD 103
2.3. LES ASTROCYTES DES SOURIS 3XTG-AD EXPRIMENT PLUS FAIBLEMENT LA PHGDH DANS L'HIPPOCAMPE 104
2.4. LES CONCENTRATIONS EN L- ET D-SÉRINE SONT DIMINUÉES DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS 3XTG-AD 109

3. L'IMPLICATION DU MÉTABOLISME DE LA L-SÉRINE DANS LES DÉFICITS COGNITIFS DES SOURIS 3XTG-AD 111

3.1. LES SOURIS 3XTG-AD PRÉSENTENT DES DYSMORPHIES ASTROCYTAIRES MAIS PAS NEURONALES 111
3.2. LA COUVERTURE ASTROCYTAIRE EST INCHANGÉE CHEZ LES SOURIS 3XTG-AD 115
3.3. LE RÉGIME ENRICHI EN L-SÉRINE RESTAURE LA MÉMOIRE SPATIALE DES SOURIS 3XTG-AD 116
3.4. LE RÉGIME ENRICHI EN L-SÉRINE RESTAURE LA TAILLE DES ASTROCYTES DES SOURIS 3XTG-AD 118

AVANT-PROPOS : Lorsque ce n'est pas décrit en légende, le détail des p-values est disponible en Annexe 3. Quelques marquages fluorescents et western-blots sont issus du travail de précédentes étudiantes de notre équipe. Sauf mention contraire, les résultats présentés concernent des souris femelles âgées de 6 mois. Les valeurs décrites sont sous la forme moyenne ± SEM (écart-type à la moyenne).

1. LOCALISATION CELLULAIRE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA L-SERINE

La voie de biosynthèse de la L-sérine (PP) est composée de trois enzymes, PHGDH, PSAT1 et PSPH. Afin de déterminer le(s) type(s) cellulaire(s) responsable(s) de la production de L-sérine dans le cerveau, nous avons d'une part analysé l'expression des protéines et ARN extraits de cultures primaires, et d'autre part réalisé des immunomarquages sur des coupes de cerveau de différentes espèces.

1.1. LE PP EST EXPRIME PAR LES ASTROCYTES *IN VITRO*

Les ARN extraits de cultures et co-cultures primaires de neurones et d'astrocytes ont été analysés par RT-qPCR ciblant les transcrits des enzymes du PP ainsi que la Sr (Figure III.1-A). Les transcrits sont significativement enrichis dans les astrocytes, sauf pour *Psph* dont l'expression est relativement faible pour les deux types cellulaires. La mise en co-culture n'influe pas sur le niveau de transcription de ces gènes, hormis pour *Psph*, dont le niveau d'expression astrocytaire devient significativement supérieure aux neurones et astrocytes cultivés seuls. L'expression de l'enzyme PHGDH a également été mesurée par western-blot (Figure III.1-B) et les résultats corroborent ceux obtenus par RT-qPCR. Les astrocytes expriment significativement plus la PHGDH que les neurones, et la mise en co-culture n'influe pas sur le niveau d'expression de la PHGDH.

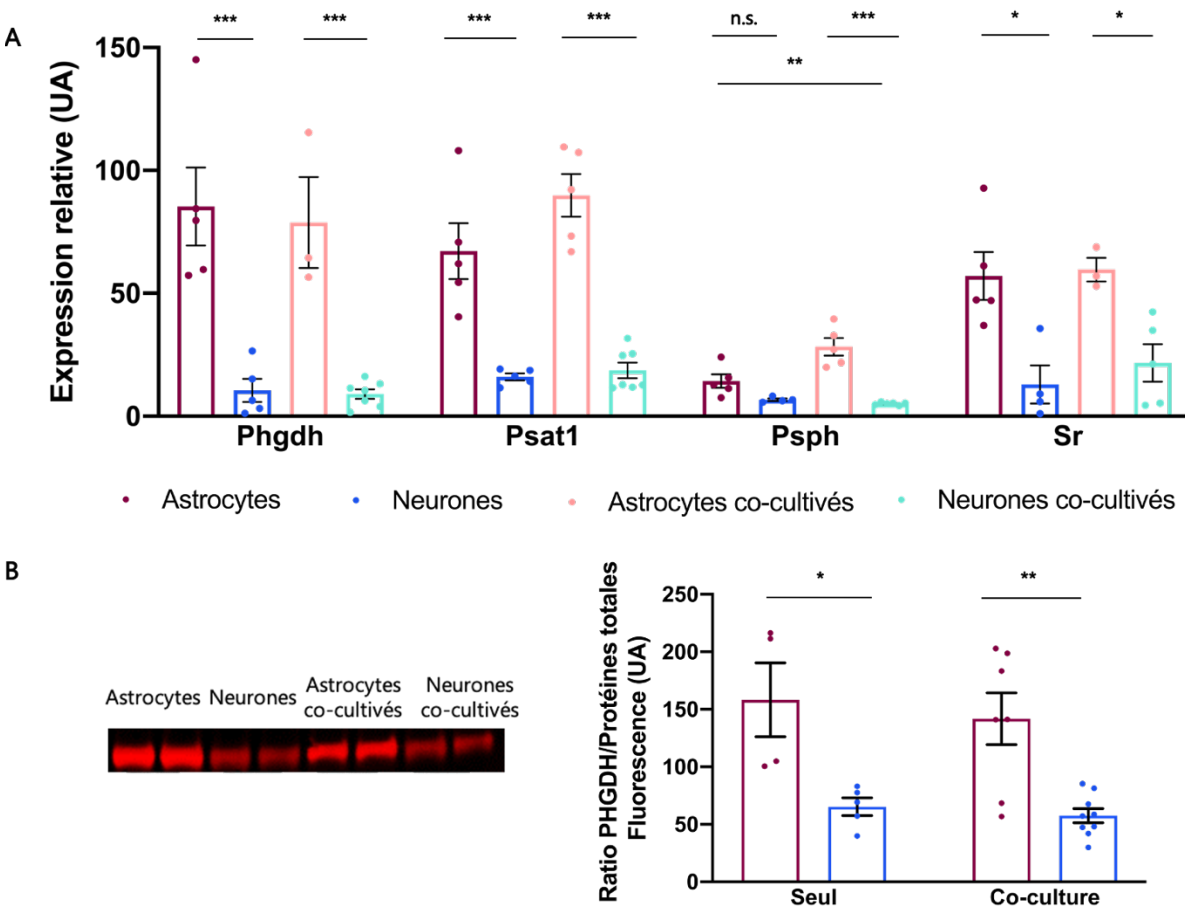


Figure III.1 – Expression relative des ARNm du PP et de la protéine PHGDH dans des cultures et co-cultures primaires d'astrocytes et de neurones. A - Quantification des ARNm des enzymes du *phosphorylated pathway* (PHGDH, PSAT1, PSPH) et de la SR par RT-qPCR. Quantification normalisée par l'expression de la cyclophiline A. **B -** Quantification par western-blot de l'enzyme PHGDH, normalisée par la quantité totale de protéines. *****, $p<0.05$; ******, $p<0.01$; *******, $p<0.001$; **n.s.**, non significatif.

1.2. L'EXPRESSION DES ENZYMES DU PP EST PRINCIPALEMENT GLIALE

Des immunomarquages de PHGDH et PSAT1 ont été réalisés sur trois espèces différentes (souris, primate non-humain et humain) (Figure III.2). Les marquages révèlent une morphologie typique des astrocytes à la fois pour PHGDH et PSAT1 (Figure III.2-G & H) à travers les trois espèces (Figure III.2-A-F, flèches noires). Le marquage PSAT1 révèle également une morphologie typique des oligodendrocytes (Figure III.2-I) pour les trois espèces (Figure III.2-D-F, flèches bleues).

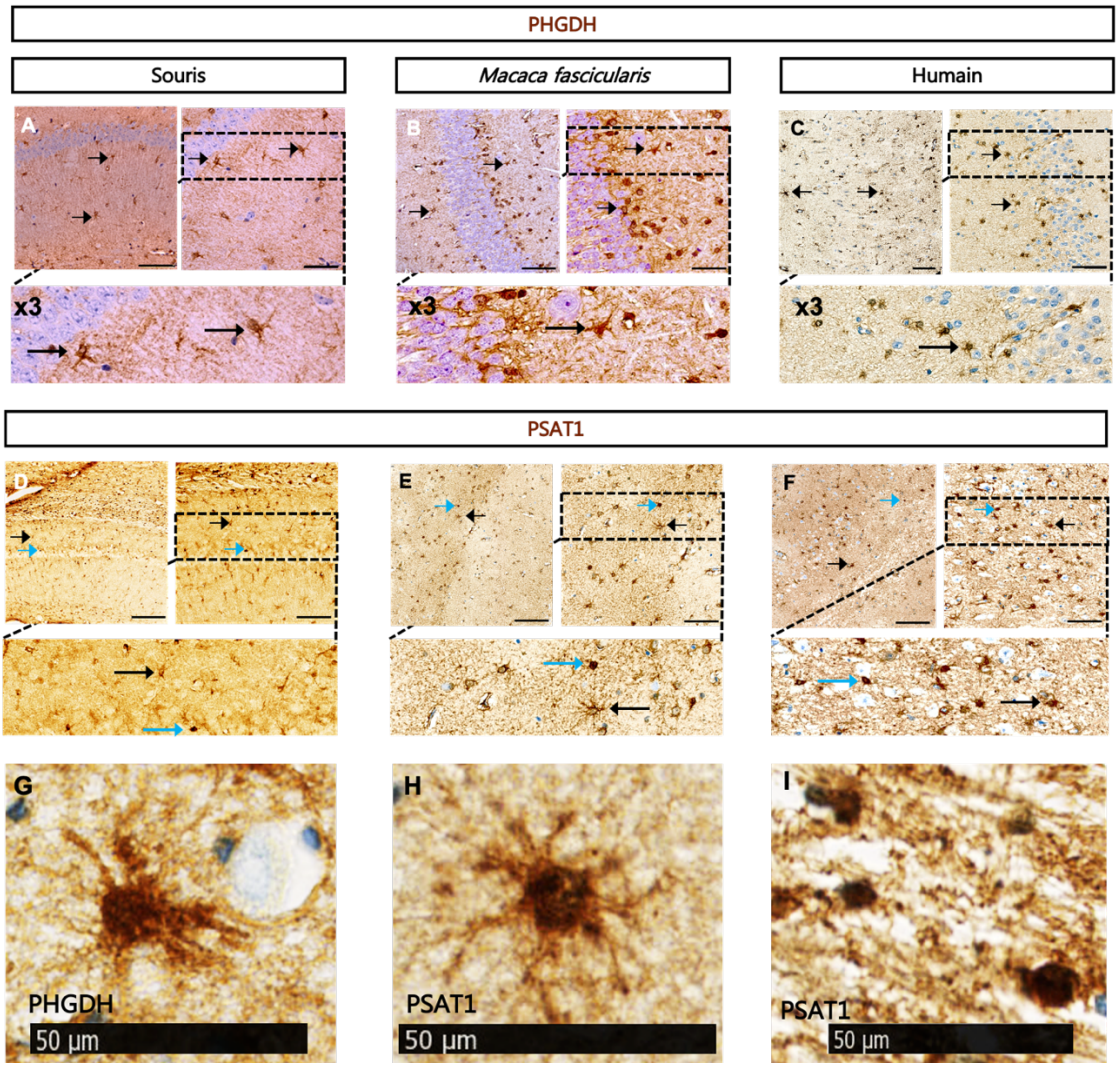


Figure III.2 – Marquages PHGDH et PSAT1 dans l'hippocampe de souris, primate non-humain et humain. Images acquises au microscope *bright-field*, dans la région CA1, chez la souris (**A & D**), le primate non-humain (**B & E**) et l'humain (**C & F-I**). Marquages à la DAB PHGDH (**haut**), PSAT1 (**milieu**). Chaque panneau est composé d'un premier carré en haut à gauche correspondant à un grossissement 20x, un second à droite correspondant à un grossissement 40x et d'un rectangle en-dessous correspondant à un zoom x3 du grossissement 40x. Barre d'échelle=50 µm. Les **flèches noires** pointent une morphologie cellulaire typique des astrocytes. Les **flèches bleues** pointent une morphologie cellulaire typique des oligodendrocytes. **G-I -** Images 40x. Marquages typiques PHGDH (**G**) et PSAT1 (**H & I**) sur tissu humain illustrant la morphologie des astrocytes (**G & H**) et des oligodendrocytes (**I**).

Afin de confirmer l'identité des cellules exprimant PHGDH et PSAT1 dans le cerveau de souris, nous avons réalisé des co-marquages fluorescents avec les marqueurs d'identité cellulaire GFAP, NeuN, Iba1 et Olig2. Les enzymes ne co-localisent pas avec NeuN et Iba1, respectivement marqueurs neuronal et microglial (Figure III.3-A-C). Elles co-localisent cependant avec GFAP, marqueur astrocytaire (Figure III.3-E-F) et également ensemble (Figure III.3-G). Les marquages PSAT1 révèlent à nouveau une forme cellulaire typique des oligodendrocytes en plus des astrocytes. Le co-marquage de PSAT1 avec Olig2, marqueur oligodendrocytaire, confirme l'expression de PSAT1 par les oligodendrocytes (Figure III.3-D).

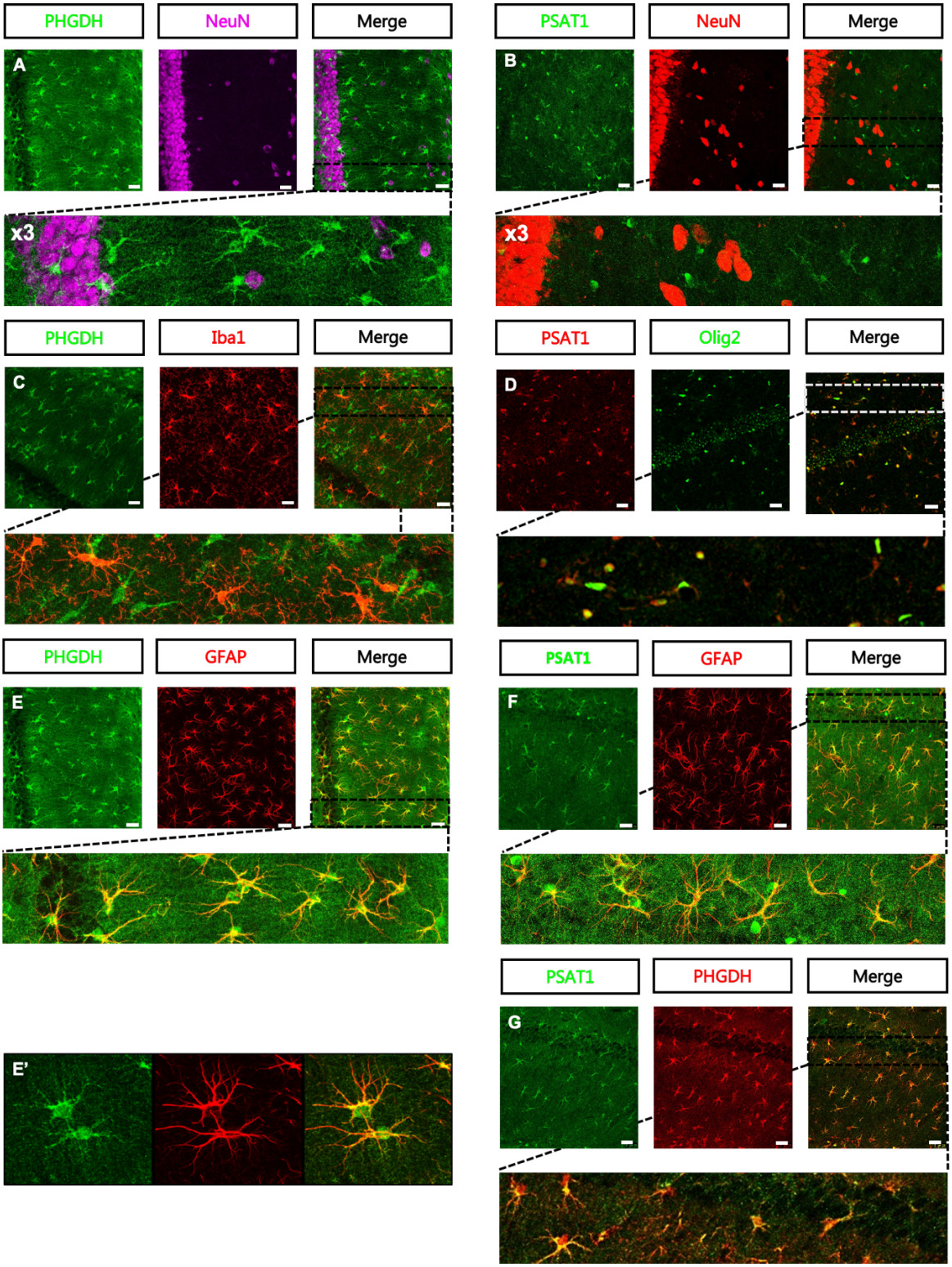


Figure III.3 – Co-Marquages fluorescents PHGDH et PSAT1 dans l'hippocampe de souris. **A-G** - Images acquises au microscope confocal, 40x et 63x (**E'**) dans la région CA1, chez la souris. Co-marquages fluorescents PHGDH/NeuN (**A**), PSAT1/NeuN (**B**), PHGDH/Iba1 (**C**), PSAT1/Olig2 (**D**), PHGDH/GFAP (**E & E'**), PSAT1/GFAP (**F**), PHGDH/PSAT1 (**G**). Barre d'échelle=50 µm.

Ces observations corroborent les données transcriptomiques (obtenues à partir de cellules murines et humaines) et immunohistologiques (marquage et hybridation *in situ* PHGDH chez la souris) de la littérature (voir chapitre I section 4.1.2). Très peu de marquages PHGDH et PSAT1 n'avaient été validés sur des tissus issus du cerveau humain. Ensemble, ces résultats confirment l'origine principalement astrocytaire, et pas neuronale, de la production de L-sérine dans le cerveau adulte de la souris, du primate non-humain et de l'humain.

2. Le PP dans le contexte de la maladie d'Alzheimer

Le principal objectif de notre étude était de déterminer si la production de L-sérine était altérée au cours de la maladie d'Alzheimer. Nous avons analysé l'expression des enzymes du PP sur des tissus humains et murins, et nous avons quantifié la concentration extracellulaire de L-sérine dans le cerveau des souris 3xTg-AD.

2.1. Le PP est altere chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer

Les expressions de PHGDH et PSAT1 ont été comparées entre des patients témoins, Alzheimer de stade IV et Alzheimer de stade VI, à partir d'homogénats de l'hippocampe et du cortex. L'expression de PHGDH diminue avec la sévérité de la maladie (Figure III.4-A), alors que celle de PSAT1 est augmentée, indifféremment du stade de sévérité (Figure III.4-B). L'expression de l'actine a également été quantifiée pour servir de contrôle, à la fois de la technique utilisée, mais également de la qualité des échantillons. L'expression de l'actine ne variant pas (Figure III.4-C), les altérations observées pour PHGDH et PSAT1 ne sont pas dues à une détérioration de l'échantillon.

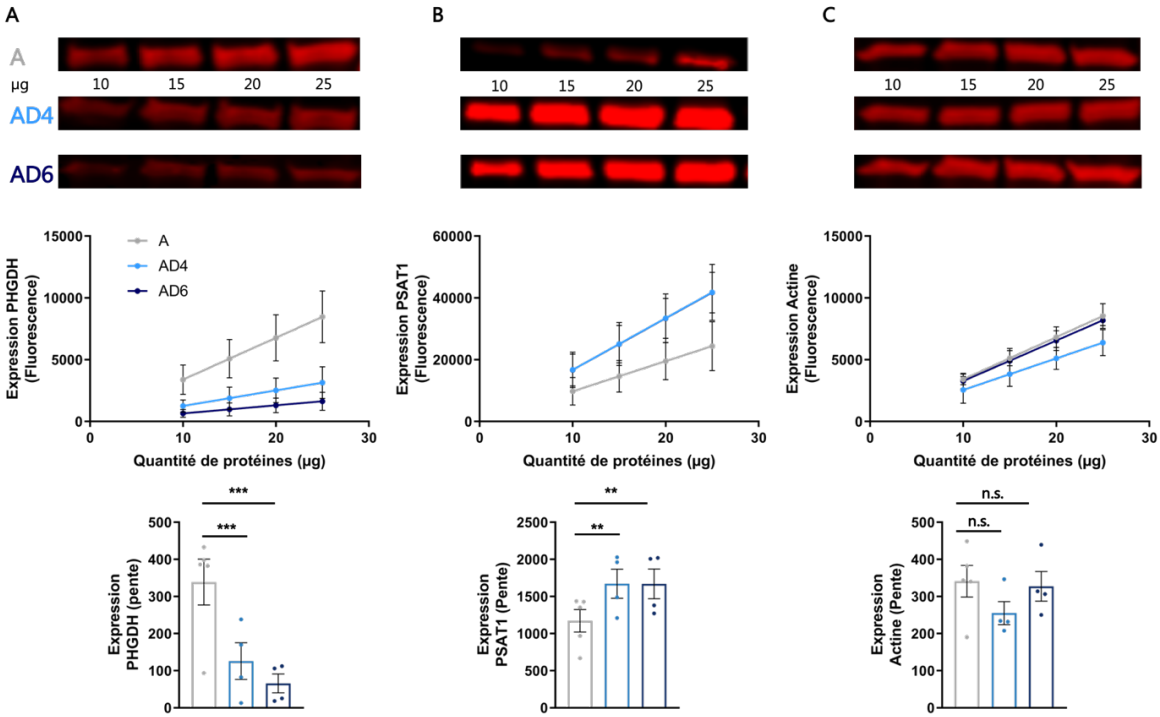


Figure III.4 – Quantification de l'expression de PHGDH, PSAT1 et de l'actine dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. A-C - Quantification par western-blot en gamme de l'expression de PHGDH (**A**), PSAT1 (**B**) et de l'actine (**C**) dans des homogénats de l'hippocampe et du cortex de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. A, Témoin ; AD4, patient atteint de la maladie d'Alzheimer stade de Braak IV ; AD6, patient atteint de la maladie d'Alzheimer stade de Braak VI. L'expression de PHGDH est diminuée (**A**) et celle de PSAT1 est augmentée (**B**, les droites AD4 et AD6 sont superposées) dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. L'expression de l'actine ne varie pas (**C**). Régression linéaire à effets multiples ; n=4-5 ; ***, p<0.001 ; **, p<0.01 ; **n.s.**, non significatif.

Nous avons également quantifié l'expression de la PHGDH chez les souris 3xTg-AD à différents âges.

2.2. L'EXPRESSION TOTALE DE LA PHGDH N'EST PAS ALTEREE DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS 3XTG-AD

Nous avons comparé l'expression de la PHGDH dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées de 6, 12 et 18 mois à celle de souris contrôles par western-blots (Figure III.5). Les résultats montrent que celle-ci n'est pas significativement différente entre les deux groupes de souris.

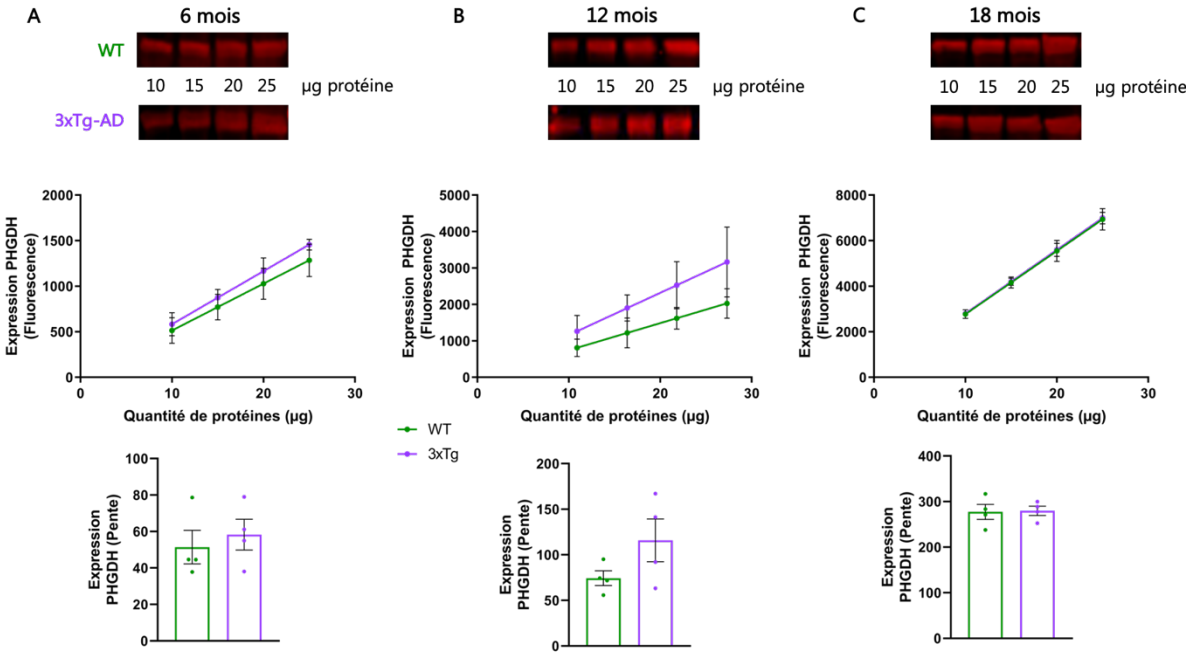


Figure III.5 – Quantification de l'expression de la PHGDH dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD et contrôles. L'expression n'est pas significativement différente à 6 mois (**A**), 12 mois (**B**) ni 18 mois (**C**). Régression linéaire à effets multiples ; n=4 ; p_{6mois}=0.6738 ; p_{12mois}=0.3824 ; p_{18mois}=0.9233.

Compte tenu de l'hétérogénéité structurelle et fonctionnelle de l'hippocampe et du caractère local de l'atteinte histopathologique, l'analyse de l'expression totale de la PHGDH ne permet peut-être pas de rendre compte de changements locaux. C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser une étude cellule par cellule dans différentes régions de l'hippocampe.

2.3. Les astrocytes des souris 3xTg-AD expriment plus faiblement la PHGDH dans l'hippocampe

La pathologie amyloïde est la première à se développer puis se propage dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD (Figure III.6-A). Si celle-ci influe sur l'expression de la PHGDH, il est probable que son effet ne soit visible que dans les sous-régions où elle apparaît.

Nous avons mesuré la fluorescence de la PHGDH dans des cellules individuelles après immunomarquage. Deux analyses ont ensuite été conduites. La première s'est attachée à comparer les moyennes de la fluorescence de PHGDH (Figure III.6-C & D), dans différentes régions et âges, mettant ainsi en avant l'expression globale de la PHGDH dans l'hippocampe. Cette première approche corrobore les résultats précédemment obtenus par western-blots, ne montrant pas de différence en terme d'expression globale de la PHGDH entre les souris 3xTg-AD et contrôles aux trois âges dans l'hippocampe (Figure III.6-D). L'analyse des moyennes dans les différentes sous-régions des animaux contrôles (Figure III.6-C) montre une expression hétérogène de la PHGDH au sein de l'hippocampe, où elle est plus fortement exprimée dans le hilus. Ces résultats justifient notre seconde analyse, visant à comparer, entre les groupes, la distribution des valeurs de fluorescence dans les différentes sous-régions.

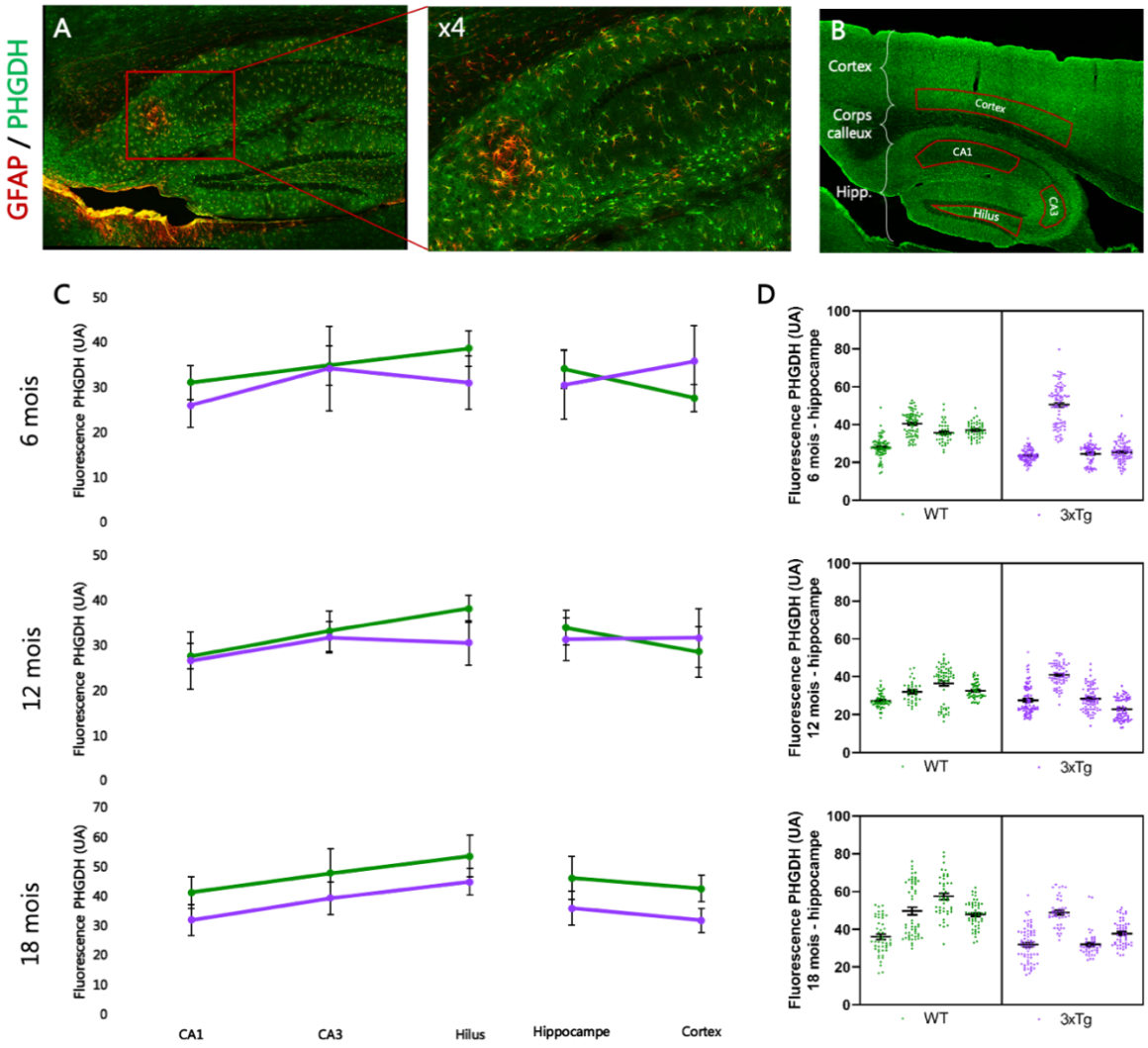


Figure III.6 – Quantification de la fluorescence PHGDH dans l'hippocampe après immunomarquage. A - Images acquises au confocal de l'hippocampe d'une souris 3xTg-AD âgée de 12 mois, 20x. A droite, zoom x4 de l'encadré rouge. Rouge marquage GFAP ; vert, marquage PHGDH. L'augmentation du marquage GFAP correspond à la réactivité astrocytaire associée à une plaque sénile dans le subiculum. Le reste de l'hippocampe n'est pas encore touché par la pathologie amyloïde. **B -** Image acquise au confocal de l'hippocampe et du cortex d'une souris contrôle, 20x. Illustration des régions étudiées. Vert, marquage PHGDH. **C -** Moyenne de la fluorescence PHGDH des cellules dans différentes sous-régions de l'hippocampe et le cortex à 6, 12 et 18 mois. La colonne hippocampe correspond à la moyenne de toutes les valeurs de CA1, CA3 et du hilus. **D -** Comparaison des valeurs de la colonne hippocampe aux trois âges. Chaque nuage de points correspond à un animal et chaque point à la valeur de fluorescence d'une cellule. Nested t-test ; n=4 ; p_{6mois}=0.5612 ; p_{12mois}=0.6273 ; p_{18mois}=0.1395.

La deuxième analyse concerne la distribution des valeurs de fluorescence de la PHGDH. Les cellules ont été séparées en trois catégories, selon leur niveau de fluorescence « fluorescence forte », « fluorescence moyenne » et « fluorescence faible » de la PHGDH (Figure III.7-A). Cette classification permet d'établir des profils d'expression de la PHGDH selon deux facteurs, l'âge (Figure III.7) et le génotype (Figures III.8 & 9) et ainsi de comparer leur influence sur l'expression de la PHGDH.

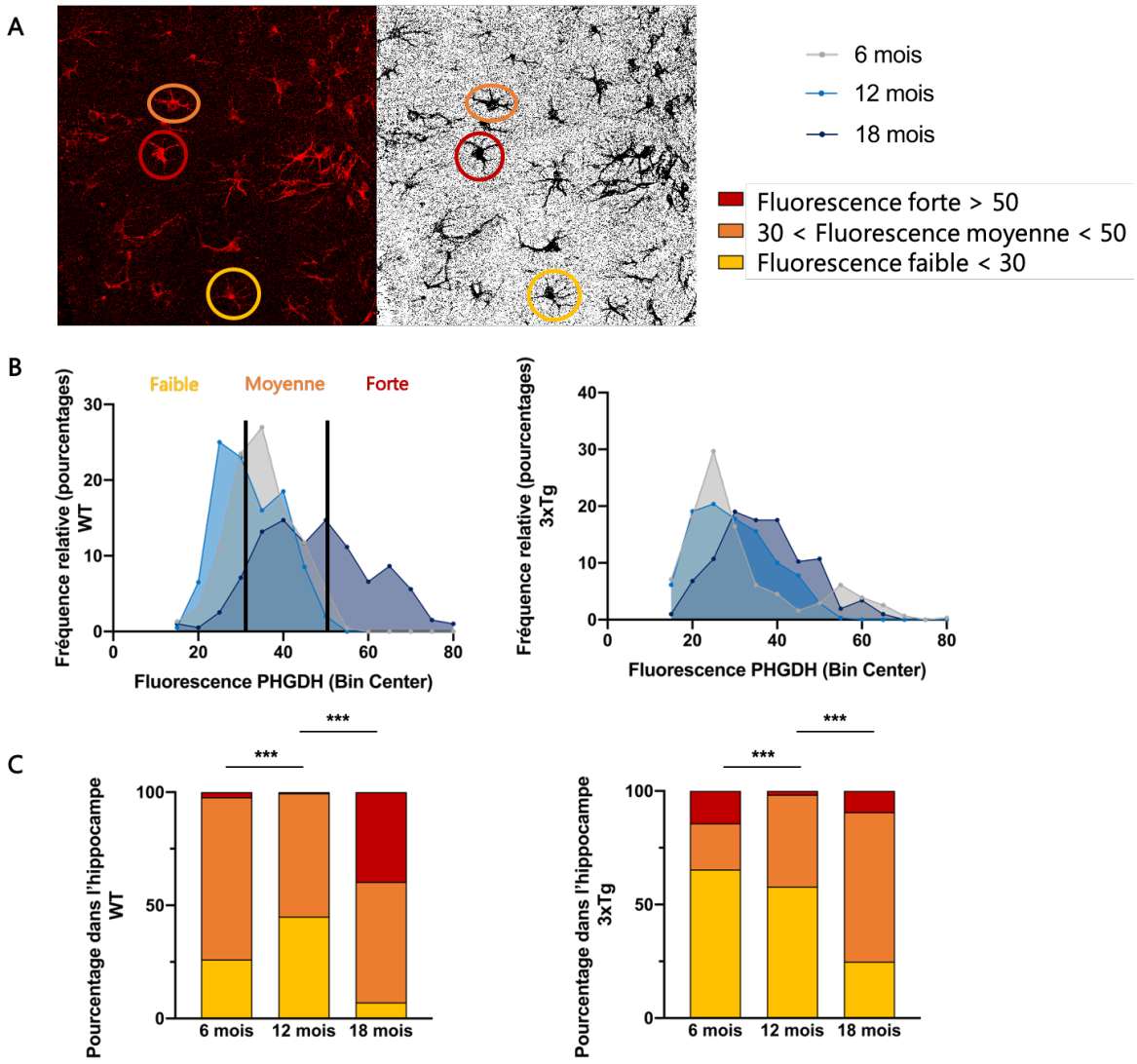


Figure III.7 – Analyse de la distribution de la fluorescence de PHGDH dans l'hippocampe en fonction de l'âge. A - Représentation de la classification des astrocytes en fonction de la fluorescence PHGDH. Rouge, fluorescence forte ; orange, fluorescence moyenne ; jaune, fluorescence faible. **B -** Distribution des valeurs dans l'hippocampe à 6, 12 et 18 mois chez les animaux contrôles (gauche) et 3xTg-AD (droite). **C -** Représentation des proportions de chaque catégorie chez les animaux contrôles (gauche) et 3xTg-AD (droite). L'âge influe sur la distribution des valeurs de PHGDH. χ^2 sur contingence ; n=4 ; *******, p<0.001.

Le vieillissement augmente l'expression de la PHGDH dans les astrocytes (Figure III.7). Les souris contrôles et 3xTg-AD présentent des profils de distribution de la PHGDH similaires entre 6 et 12 mois. A 18 mois, il y a une augmentation nette de la catégorie fluorescence forte chez les souris contrôles (6 mois, fluorescence forte=2.17% ; 18 mois, fluorescence forte=39.59%). L'effet du vieillissement est moins marqué chez les souris 3xTg-AD puisqu'il n'entraîne qu'une augmentation de la catégorie fluorescence moyenne (6 mois, fluorescence moyenne=20.32% ; 18 mois, fluorescence moyenne=65.85%).

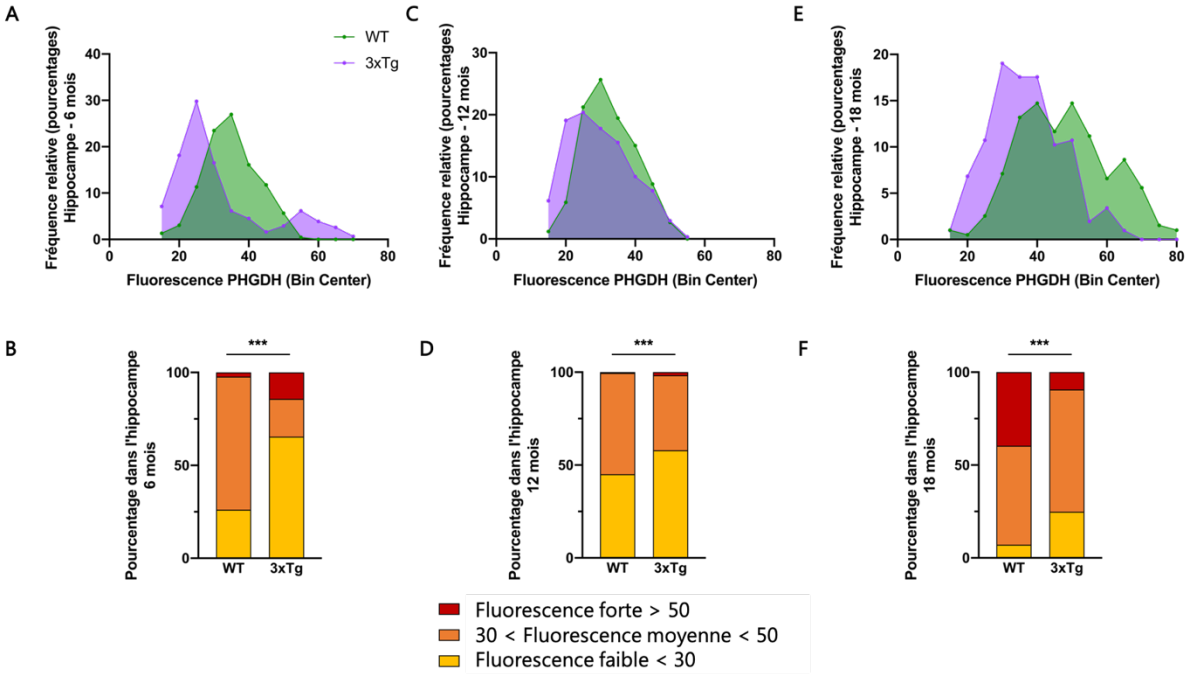


Figure III.8 – Analyse de la distribution de la fluorescence de la PHGDH dans l'hippocampe. Comparaison de la distribution des valeurs de fluorescence de la PHGDH dans l'hippocampe entre animaux contrôles et 3xTg-AD à 6 (**A & B**), 12 (**C & D**) et 18 (**E & F**) mois. Rouge, fluorescence forte ; orange, fluorescence moyenne ; jaune, fluorescence faible. Les souris 3xTg-AD présentent une plus grande proportion de cellules exprimant faiblement la PHGDH aux trois âges. χ^2 sur contingence ; n=4 ; ***, p<0.001.

Concernant l'effet du génotype, aux trois âges, dans l'hippocampe, la distribution de la PHGDH chez les souris 3xTg-AD est significativement décalée vers des valeurs plus faibles que chez les souris contrôles (Figure III.8-A, C & E).

A 6 mois, la proportion des valeurs de fluorescence faible est plus grande chez les souris 3xTg-AD (Figure III.8-B ; WT, faible=26.09% ; 3xTg-AD, faible=65.48%). Ce changement n'influe pas sur la moyenne des valeurs (Figure III.6-D) du fait de de la plus grande proportion des valeurs fortes chez les souris 3xTg-AD (Figure III.8-B ; WT, forte=2.17% ; 3xTg-AD, forte=14.19%).

A 12 mois, la proportion de chaque catégorie est assez similaire (Figure III.8-D), alors qu'à 18 mois, les souris 3xTg-AD présentent une plus faible proportion des valeurs fortes (Figure III.8-F ; WT, forte=39.59% ; 3xTg-AD, forte=9.27%)

Nous avons également analysé la distribution des valeurs de fluorescence de la PHGDH dans les sous-régions de l'hippocampe (Figure III.9). Aux trois âges, le hilus est la sous-région où la proportion de valeurs fortes est la plus élevée, suivent CA3 puis CA1.

A 6 et 18 mois, le décalage de la fluorescence de la PHGDH vers des valeurs faibles est globalement homogène à travers les sous-régions de l'hippocampe des souris 3xTg-AD. A 12 mois, les proportions des 3 catégories sont plutôt similaires dans CA1 et CA3 (Figure III.9-B & E), mais la proportion des valeurs faibles est bien plus élevée dans le hilus (Figure III.9-H). Il est probable qu'à 12 mois, l'effet du génotype s'oppose à l'effet du vieillissement (augmentation de la proportion des valeurs fortes), expliquant ainsi la similarité des profils de distribution entre animaux contrôles et 3xTg-AD à cet âge.

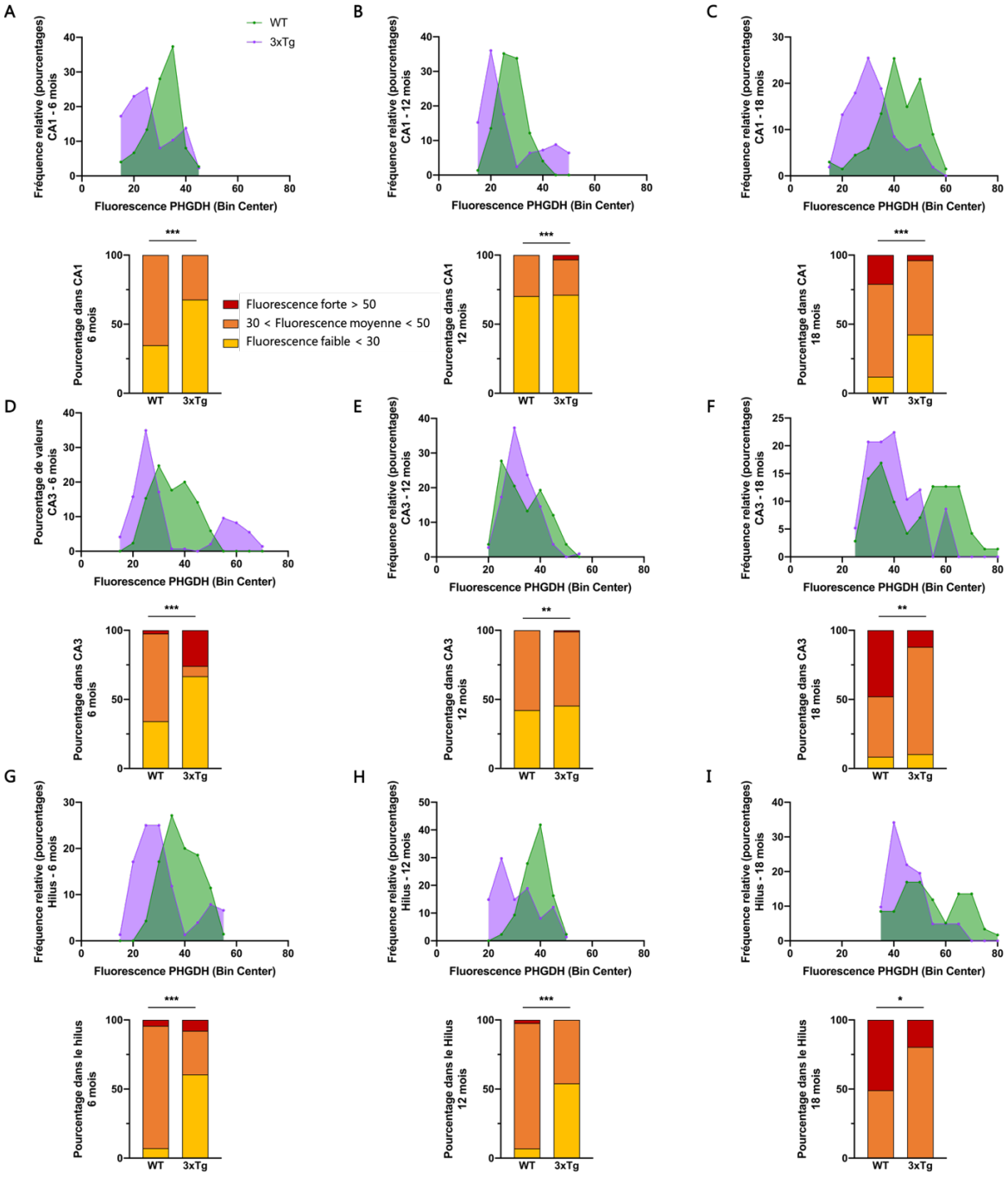


Figure III.9 – Analyse de la distribution de la fluorescence de la PHGDH dans les sous-régions de l'hippocampe. Comparaison de la distribution des valeurs de fluorescence de la PHGDH dans les sous-régions de l'hippocampe entre animaux contrôles et 3xTg-AD à 6 (**A, D & G**), 12 (**B, E & H**) et 18 (**C, F & I**) mois. **A - C** CA1. **D - F**, CA3. **G - I**, Hilus. **Rouge**, fluorescence forte ; **orange**, fluorescence moyenne ; **jaune**, fluorescence faible. Chez les souris 3xTg-AD, toutes les sous-régions présentent une augmentation de la proportion des valeurs faibles et/ou moyennes au détriment des valeurs moyennes et/ou fortes. χ^2 sur contingence ; n=4 ; ***, $p<0.001$; **, $p<0.01$; *, $p<0.05$.

L'ensemble de ces données suggère que l'expression de la PHGDH dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD n'est pas massivement altérée (Figure III.6), même si une proportion plus importante des astrocytes des souris 3xTg-AD présente des valeurs faibles

de fluorescence de la PHGDH par rapport aux souris contrôles (Figure III.8). Cet effet du génotype ne semble pas être dû à la propagation de la pathologie amyloïde, car il est observable même dans des sous-régions qui n'en sont pas encore atteintes (par exemple, le hilus à 6 mois, Figure III.9). Ces données sont à considérer avec précaution, car la quantification de la fluorescence de la PHGDH ne fournit pas une valeur quantitative absolue de son niveau d'expression.

Les souris 3xTg-AD présentent une diminution du métabolisme glucidique dans l'hippocampe dès 6 mois (voir chapitre I section 3.3.3). Nous avons voulu savoir si la diminution de la disponibilité du substrat (3PG) et/ou les diminutions relatives de l'expression de la PHGDH observées dans ce modèle pouvaient avoir un impact sur la production de L-sérine.

2.4. Les concentrations en L- et D-serine sont diminuees dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD

Nous avons collecté par microdialyse le milieu extracellulaire dans la région CA1 de l'hippocampe de souris (Figure III.10-A) et analysé sa composition par LC-MS-MS, afin de mesurer les concentrations extracellulaires de différents acides aminés (Figure III.10-B-D). La collecte s'est déroulée sur 24 h, permettant une analyse des concentrations pendant les phases d'éveil et de sommeil. Les souris sont vigiles afin d'éviter d'éventuels effets liés aux anesthésiants. Les souris 3xTg-AD présentent une concentration diminuée en L- et D-sérine dans l'hippocampe (Figure III.10-B & C), comparé aux souris contrôles (L-sérine, $\bar{x}_{WT}$=16.61 $\pm$ 1.73 µM ; $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD}$=7.63 $\pm$ 1.70 µM ; D-sérine, $\bar{x}_{WT}$=4.53 $\pm$ 0.72 µM ; $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD}$= 2.90 $\pm$ 0.38 µM). La concentration de glutamate n'est pas altérée (Figure III.10-D). Aucune variation liée au cycle veille/sommeil n'est visible pour les trois acides aminés.

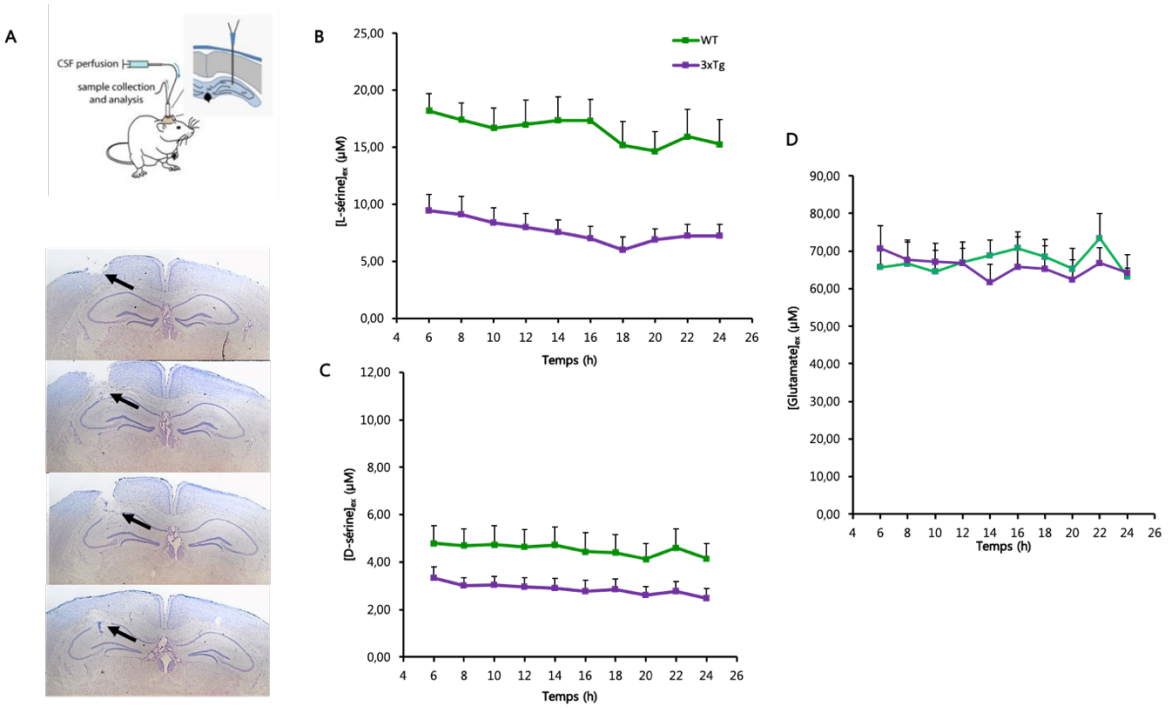


Figure III.10 – Analyse par LC-MS/MS des concentrations extracellulaires de L-, D-sérine et glutamate après microdialyse de l'hippocampe. A - Schéma explicatif de la microdialyse et zone d'implantation de la membrane de microdialyse. La flèche noire représente l'insertion de la microdialyse dans la région CA1 de l'hippocampe. **B-D -** Mesures par LC-MS/MS de la concentration extracellulaire de L-sérine (**B**), D-sérine (**C**) et glutamate (**D**). Les souris 3xTg-AD (violet) présentent une concentration diminuée de L- et D-sérine comparé aux animaux contrôles (vert). Il n'y a pas de différence concernant la concentration extracellulaire de glutamate. ANOVA sur mesures répétées ; n=7 ; L-sérine, $F(1,10)=15.691$, $p=0.0027$; D-sérine, $F(1,11)=5.4482$, $p=0.0396$.

Nos résultats montrent une diminution de la L-sérine dans l'hippocampe. Étant donné l'importance de cet acide aminé dans la synthèse de nombreux lipides, nous avons souhaité déterminer si son absence pouvait avoir un impact sur la morphologie cellulaire.

3. L'implication du metabolisme de la L-serine dans les deficits cognitifs des souris 3xTg-AD

Afin d'étudier la morphologie des astrocytes et des neurones chez les souris 3xTg-AD, nous les avons numériquement reconstruits et analysés. Pour ce faire, les souris contrôles et 3xTg-AD ont été injectées avec un AAV par voie rétro-orbitaire permettant l'expression de la GFP dans les neurones et/ou les astrocytes. La concentration de vecteurs viraux a été diluée, de sorte que le marquage dans l'hippocampe facilite l'isolement des astrocytes (Figure III.11-A-B). L'acquisition haute résolution au microscope confocal suivie de la reconstruction 3D (Figure III.11-C) nous ont permis d'étudier la morphologie des astrocytes (Figure III.11) ainsi que les densités de boutons synaptiques et épines dendritiques (Figure III.12).

L'analyse morphologique des astrocytes est souvent réalisée à partir d'un marquage GFAP, qui ne rend compte que d'une partie de leur architecture puisque la GFAP n'est présente que dans les branches principales des astrocytes. Notre approche par remplissage du cytoplasme, plus sensible, permet de révéler la morphologie de la cellule jusqu'à la limite de diffraction du microscope (0.26 µm), donnant lieu à une analyse morphométrique plus fine et précise.

Nous avons également comparé la densité de synapses entre souris contrôles et 3xTg-AD à l'aide de la microscopie électronique (Figure III.13). Les images ont été acquises en série, présentant l'avantage de pouvoir suivre les éléments en z, et donc de pouvoir définir avec plus de certitude la présence d'éléments pré- et post-synaptiques.

3.1. Les souris 3xTG-AD presentent des dysmorphies astrocytaires mais pas neuronales

Nous avons comparé le nombre de branches partant du soma, le nombre total de branches et le nombre de points terminaux des astrocytes de la région CA1 de l'hippocampe (Figure III.11-D-G). Aucune différence n'a été mise en avant, suggérant que les astrocytes des souris contrôles et des souris 3xTg-AD ne diffèrent pas en terme de complexité. Nous avons également analysé le territoire couvert par les astrocytes, différent de leur volume, puisque prenant en compte les espaces entre les branches, à travers une modélisation convex hull. Les astrocytes des souris 3xTg-AD couvrent un territoire significativement plus petit que les astrocytes des souris contrôles (Figure III.11-G & H ; $\bar{x}_{WT}$=108 494 ± 7 470 µm^3 ; $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD}$=56 903 ± 5 960 µm^3).

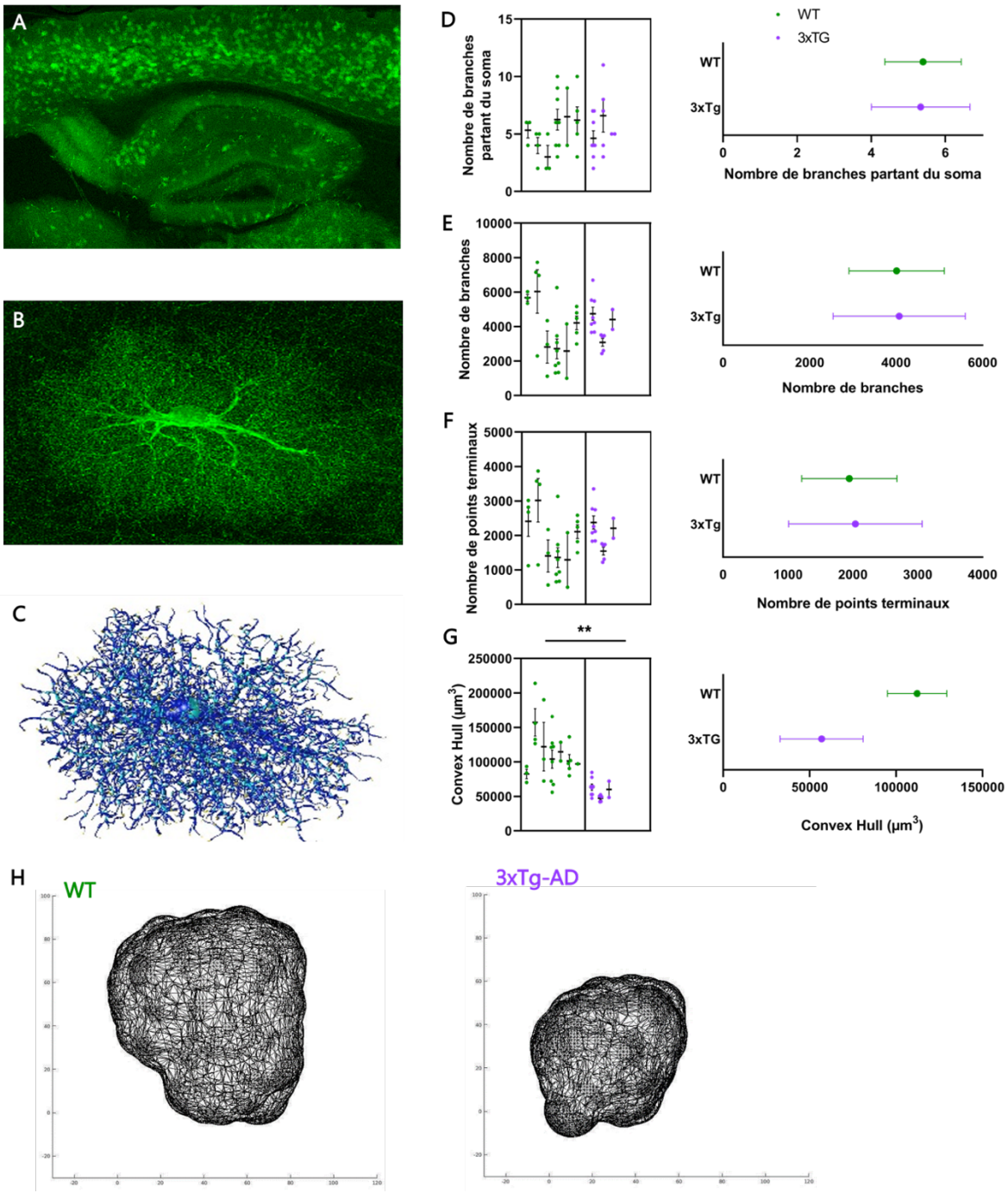


Figure III.11 – Analyses morphométriques des astrocytes. A - Image de l'hippocampe acquise au confocal 20x ; vert, GFP. L'injection rétro-orbitaire permet d'infecter les astrocytes de l'hippocampe de façon éparse pour faciliter leur isolation. **B -** Image haute résolution acquise au confocal 63x d'un astrocyte de la région CA1 de l'hippocampe. **C -** Reconstruction 3D de l'astrocyte (**B**). **D-F -** Comparaison de la complexité des astrocytes, animaux contrôles (vert) et 3xTg-AD (violet). Le nombre de branches partant du soma (**D**), le nombre total de branches (**E**) et le nombre de points terminaux ont été analysés. A **droite**, moyennes et écart-types des valeurs. **G -** Analyse convex hull des astrocytes. Le convex hull permet de modéliser le territoire couvert par les astrocytes. **H -** Représentation des analyses convex hull. Les astrocytes des animaux contrôles et 3xTg-AD ne diffèrent pas en terme de complexité. Les astrocytes 3xTg-AD couvrent un territoire plus petit que ceux des animaux contrôles. Nested t-test, n=3-6 ; p=0.0056.

En ce qui concerne les neurones, nous avons tout d'abord reconstruit les dendrites des neurones de CA1 et les axones provenant vraisemblablement de CA3 et projetant sur les dendrites de CA1. Cette reconstruction nous a permis de comparer les densités de boutons synaptiques sur les axones et des différents types d'épines (*stubby*, *mushroom*, *thin*) sur les dendrites (Figure III.12). L'analyse statistique préliminaire (n_{WT}=2) n'a montré aucune différence significative entre animaux contrôles et 3xTg-AD.

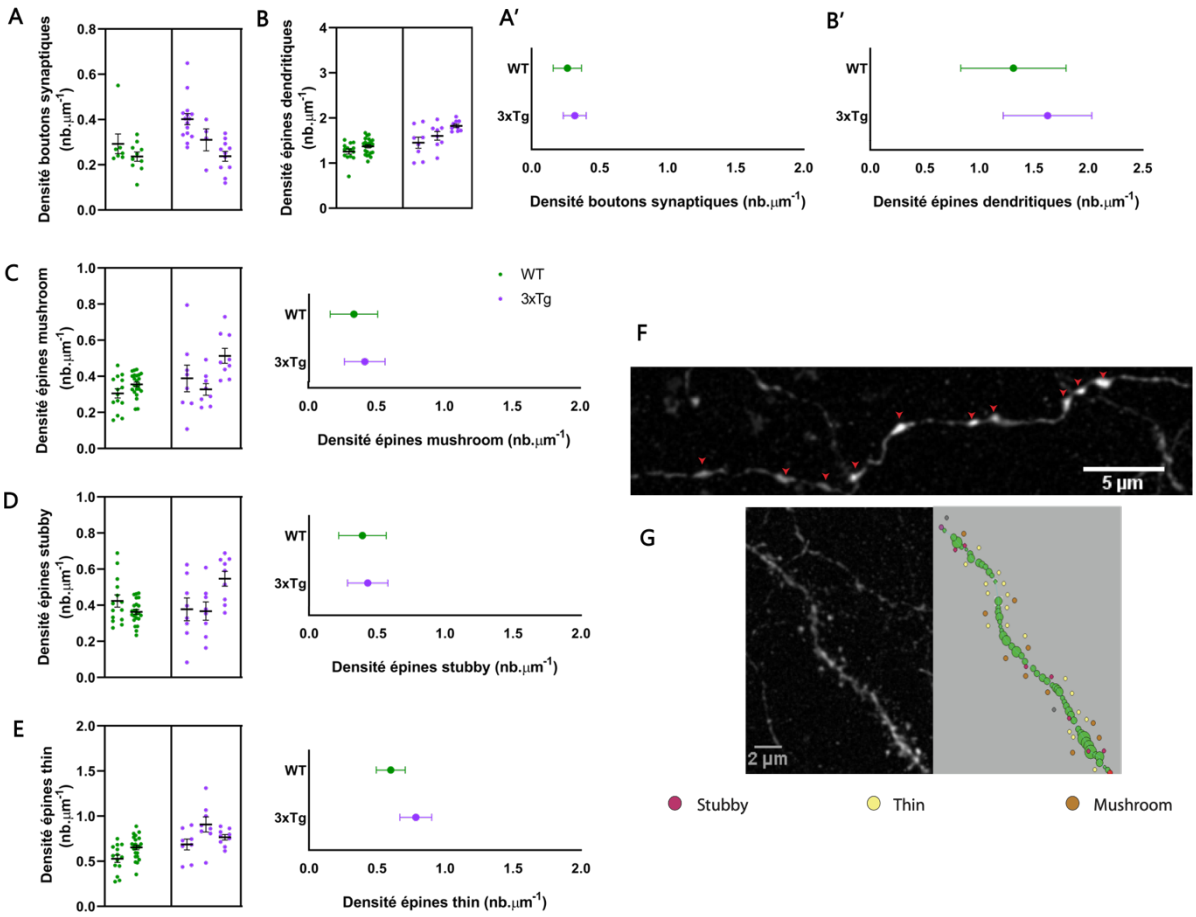


Figure III.12 – Analyses morphométriques des neurones. A & A' - Comparaison de la densité de boutons synaptiques entre animaux contrôles et 3xTg-AD. **B & B' -** Comparaison de la densité d'épines dendritiques totale. **C -** Comparaison de la densité d'épines de type *mushroom*. **D -** Comparaison de la densité d'épines de type *stubby*. **E -** Comparaison de la densité d'épines de type *thin*. **F -** Axone exprimant la GFP (**blanc**) provenant de CA3 dans CA1. Les **flèches rouges** pointent les boutons synaptiques. **G -** Dendrite exprimant la GFP (**blanc**) de CA1. A droite, modélisation de la dendrite et des épines qu'elle porte. Il n'y a aucune différence significative entre animaux contrôles et 3xTg-AD en terme de densité des éléments synaptiques. Nested t-test ; n=2-3.

Les éléments pré- et post-synaptiques peuvent être présents sans pour autant former une synapse. C'est pourquoi nous avons décidé de comparer les densités synaptiques entre animaux contrôles et 3xTg-AD, à l'aide de la microscopie électronique (Figure III.13). Les synapses ont été référencées selon leur morphologie en deux catégories. Les synapses symétriques sont supposées inhibitrices (GABAergiques) et les synapses

asymétriques sont supposées excitatrices (glutamatergiques). Il n'y a aucune différence en terme de densité synaptique entre les animaux contrôles et les souris 3xTg-AD.

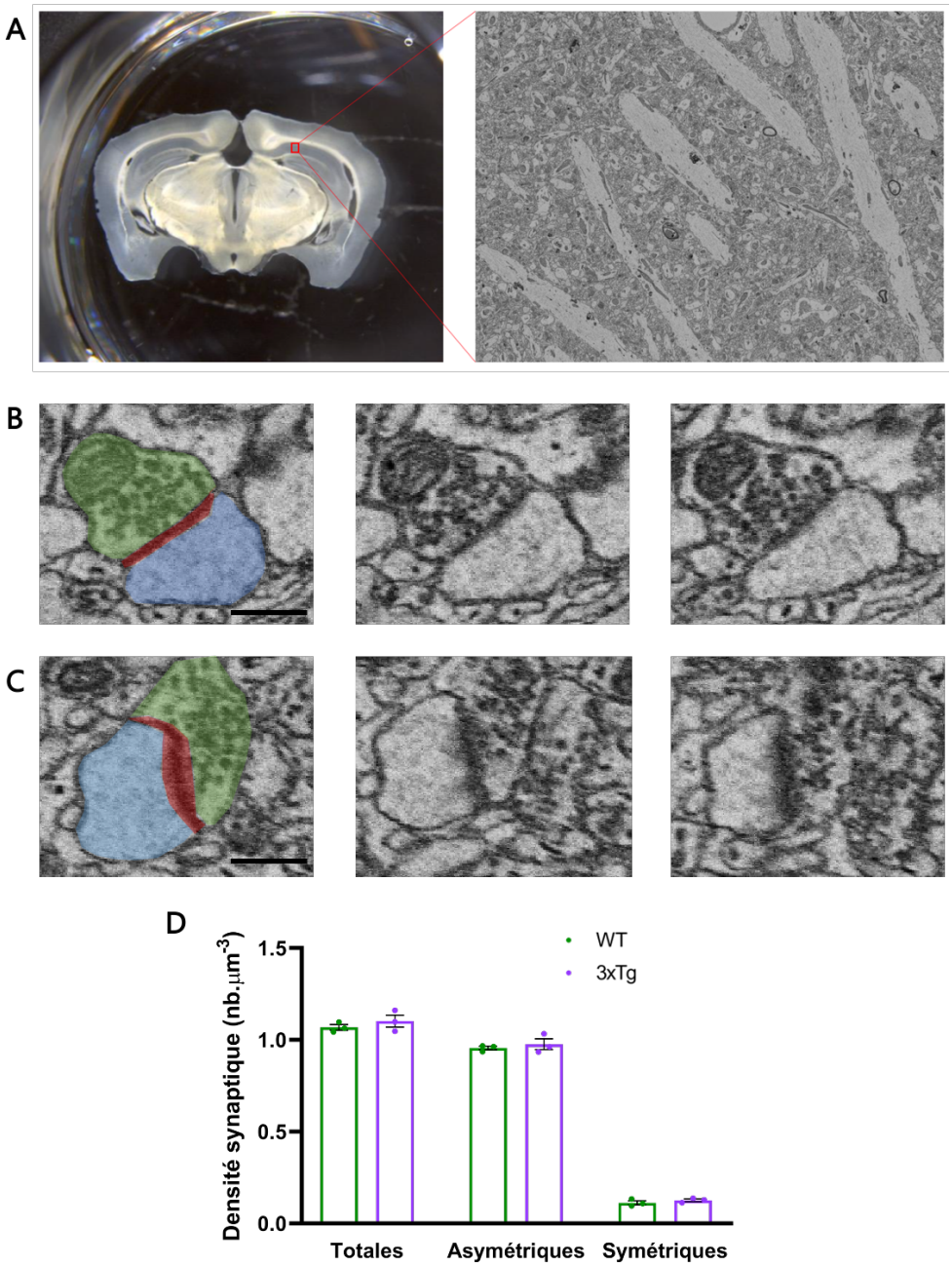


Figure III.13 – Analyse de la densité synaptique par microscopie électronique. **A -** Localisation des images acquises par microscopie électronique. Zone CA1 de l'hippocampe. **B -** Illustration d'une synapse symétrique, supposée inhibitrice. **C -** Illustration d'une synapse asymétrique, supposée excitatrice. Barre d'échelle=500 nm. Images en série. Vert, élément pré-synaptique ; Bleu, élément post-synaptique ; Rouge, PSD (*post-synaptic density*). **D -** Comparaison des densités synaptiques entre animaux contrôles et 3xTg-AD. La différence entre synapse symétrique et asymétrique est basée sur l'épaisseur de la PSD. Il n'y a aucune différence significative entre les animaux contrôles et 3xTg-AD. Multiple t-tests ; n=3.

Les astrocytes des souris 3xTg-AD couvrent en moyenne un territoire deux fois plus petits que ceux des animaux contrôles et aucune différence morphologique n'a été mise en évidence concernant les éléments pré- et post-synaptiques. Si les astrocytes couvrent un territoire plus petit, il est probable que la couverture astrocytaire des synapses soit impactée. Nous avons donc évalué la couverture astrocytaire des synapses de la région CA1 de l'hippocampe, à partir des mêmes images de microscopie électronique.

3.2. La couverture astrocytaire est inchangee chez les souris 3xTg-AD

Les synapses ont été réparties en trois catégories selon leur(s) contact(s) avec des astrocytes (Figure III.14-A). La classe 1 correspond aux synapses n'ayant aucun contact avec un astrocyte. La classe 2 correspond aux synapses étant en contact avec un astrocyte, mais pas au niveau de la fente synaptique. La classe 3 regroupe les synapses dont la fente synaptique est couverte par un pied astrocytaire (Figure III.14-B). Les densités de chaque classe synaptique sont similaires entre les animaux contrôles et 3xTg-AD (Figure III.14-C). La comparaison des densités totales est en accord avec les résultats précédemment obtenus (Figure III.13). Les synapses de classe 1 sont les moins représentées dans la région CA1 de l'hippocampe. La répartition dans ces catégories est similaire entre les animaux contrôles et 3xTg-AD (Figure III.14-D ; classe 1, WT=24 $\pm$ 2%, 3xTg-AD=25 $\pm$ 5% ; classe 2, WT=34 $\pm$ 1%, 3xTg-AD=40 $\pm$ 3% ; classe 3, WT=42 $\pm$ 3%, 3xTg-AD=35 $\pm$ 2%), suggérant que la diminution de la biodisponibilité en L-sérine dans le cerveau des souris 3xTg-AD n'impacte pas les interactions morphologiques entre synapses et astrocytes.

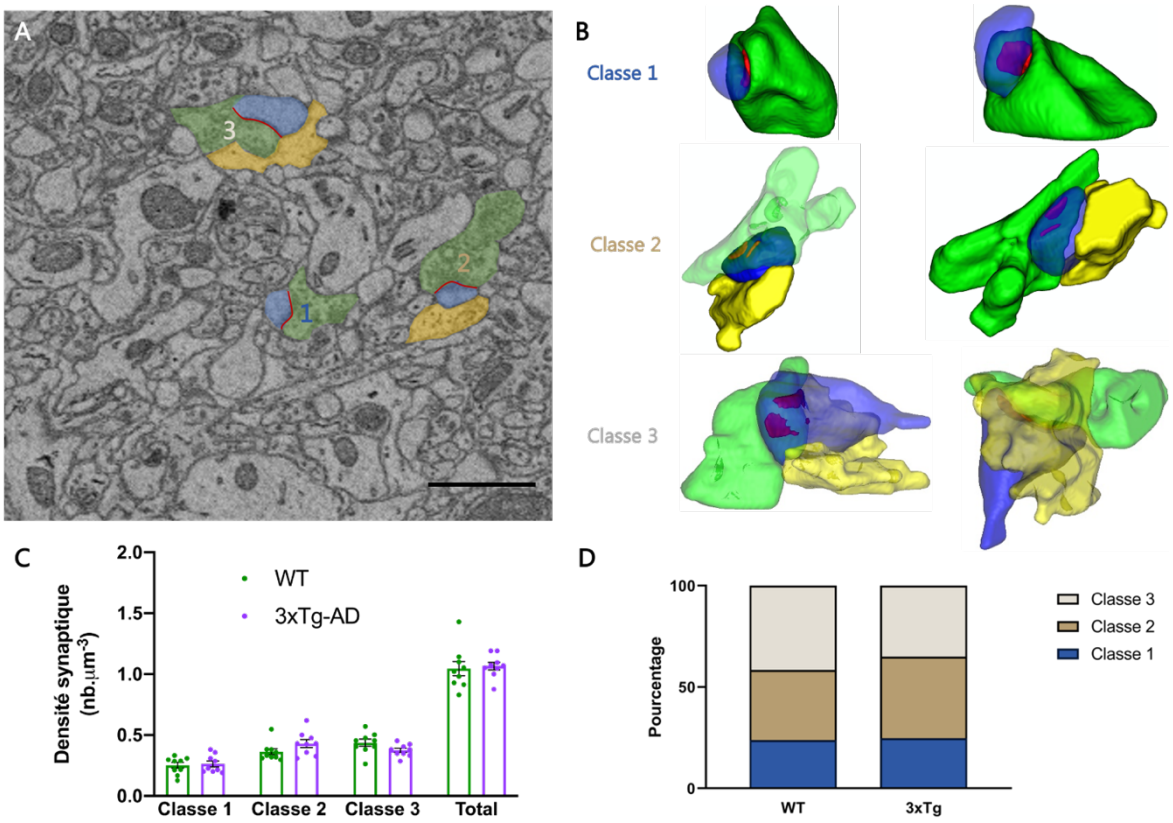


Figure III.14 – Analyse de la couverture astrocytaire des synapses. A - Image acquise par microscopie électronique de la région CA1 de l'hippocampe. Illustration des trois classes de synapses. Vert, élément pré-synaptique ; Bleu, élément post-synaptique ; Jaune, astrocyte ; Rouge, PSD. Barre d'échelle=500 nm. **B -** Reconstruction 3D des synapses illustrées en A. Les reconstructions à droite et à gauche sont les mêmes sous différentes orientations. L'astrocyte des synapses de classe 3 recouvre la fente synaptique. **C -** Comparaison de la densité de chaque classe synaptique entre animaux contrôles et 3xTg-AD. Les densités sont similaires entre les deux groupes. Multiple t-tests ; n=3. **D -** Analyse de la distribution de chaque classe synaptique entre animaux contrôles et 3xTg-AD. La proportion de chaque classe est similaire entre les deux groupes. χ^2 sur contingence ; n=3.

Les souris 3xTg-AD présentent des déficits cognitifs, une diminution de la biodisponiblité en L-sérine dans le cerveau, ainsi qu'une altération morphologique des astrocytes. Nous avons cherché à restaurer les concentrations extracellulaires en L-sérine dans le cerveau des souris 3xTg-AD au niveau de celles de animaux contrôles afin de définir s'il existe un lien entre la L-sérine et les déficits que présentent ces souris. Pour ce faire, nous avons nourri les souris durant deux mois avec un régime enrichi à 10% en L-sérine.

3.3. Le regime enrichi en L-serine restaure la memoire spatiale des souris 3xTg-AD

Le régime alimentaire enrichi en L-sérine est efficace et suffisant pour augmenter les concentrations extracellulaires de L-sérine dans le cerveau des animaux 3xTg-AD (Figure III.15-B ; $\bar{x}_{WT}$=16.61 ± 1.73 µM ; $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD}$=7.63 ± 1.70 µM ; $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD+L}$= 24.91 ± 6.29 µM). L'augmentation de la L-sérine se traduit également par une augmentation des

concentrations extracellulaires de D-sérine (Figure III.15-C ; $\bar{x}_{WT}$=4.53 ± 0.72 µM ; $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD}$= 2.90 ± 0.38 µM ; $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD+L}$= 8.22 ± 1.79 µM). L'effet de ce régime sur la mémoire spatiale des animaux a été mesuré par le test de la piscine de Morris. Les courbes d'apprentissage de la localisation de la plateforme dans la piscine sont similaires entre les groupes (Figure III.15-D). Lorsque la plateforme a été retirée le jour du test, les déplacements des souris dans la piscine ont été enregistrés pendant une minute (Figure III.15). Comme attendu, les souris 3xTg-AD passent 25% de leur temps dans le cadran cible, signifiant qu'elles n'ont pas retenu la localisation de la plateforme. Néanmoins, lorsqu'elles ont suivi le régime L-sérine, elles passent autant de temps que les animaux contrôles dans la cadran cible, signifiant une restauration de leurs capacités de mémorisation spatiale.

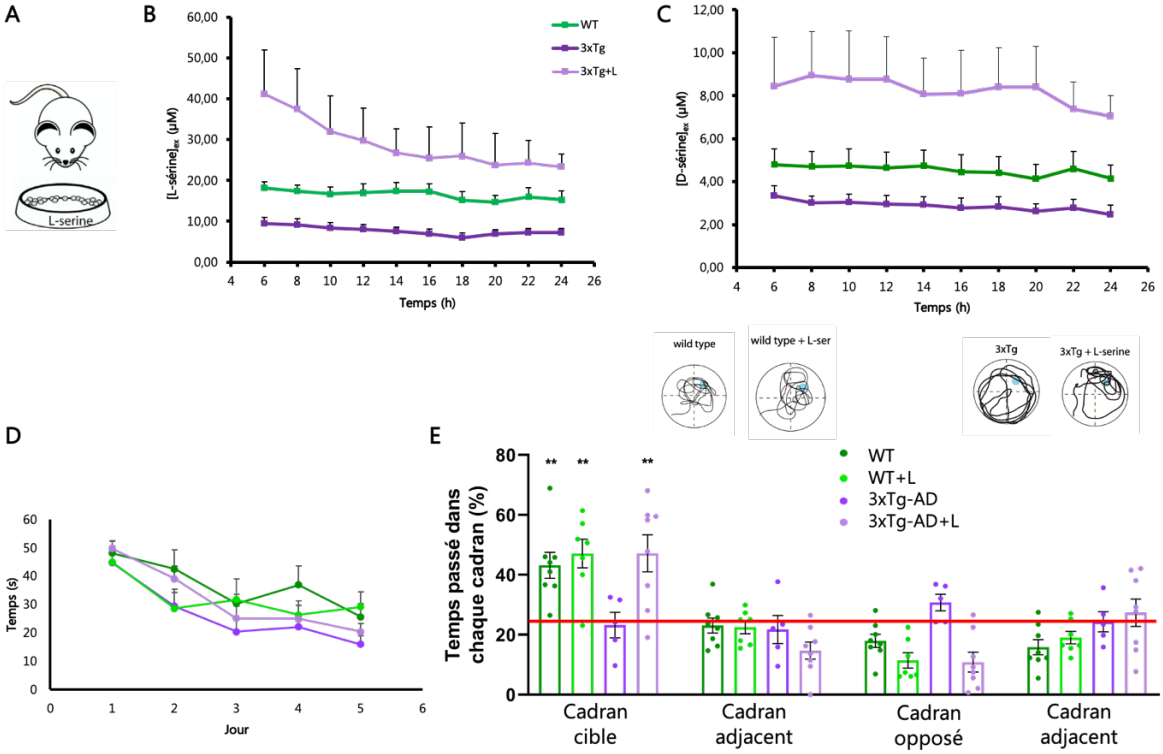


Figure III.15 – La supplémentation chronique en L-sérine augmente les concentrations extracellulaires en L-sérine dans le cerveau et restaure les déficits de mémorisation spatiale des souris 3xTg-AD. A - Les souris contrôles et 3xTg-AD ont suivi un régime enrichi à 10% en L-sérine pendant deux mois. **B & C -** Mesures par LC-MS/MS après microdialyse dans la région CA1 de l'hippocampe des concentrations extracellulaires en L-sérine (**B**) et D-sérine (**C**) chez les animaux contrôles et 3xTg-AD, avec ou sans régime L-sérine. **D & E -** Évaluation de la mémoire spatiale des souris contrôles et 3xTg-AD, avec ou sans régime L-sérine, par le test de la piscine de Morris. **D -** Courbes d'apprentissage. **E -** Test de mémoire spatiale. La **ligne rouge** représente 25%. En **haut**, les déplacements types des animaux de chaque groupe. Les souris 3xTg-AD ne passent pas plus de temps dans le cadran cible que dans les autres cadrans. Les souris contrôles et 3xTg-AD passent plus de 25% de leur temps dans le cadran cible. T-test contre 25% ; n=4-8 ; cadran cible, p_{WT}=0.0037, p_{WT+L}=0.0011, $p_{3xTg\text{-}AD}$=0.19, $p_{3xTg\text{-}AD+L}$=0.007.

La supplémentation en L-sérine induit donc des effets bénéfiques sur la mémoire spatiale des souris 3xTg-AD, en la restaurant au niveau de celle des animaux contrôles. Étant donné la diminution de la taille des astrocytes chez les souris 3xTg-AD, nous avons

voulu voir si la supplémentation en L-sérine avait également un effet sur la taille des astrocytes.

3.4. Le regime enrichi en L-serine restaure la taille des astrocytes des souris 3xTg-AD

Nous avons reconstruit les astrocytes des souris ayant suivi le régime enrichi en L-sérine de la même façon que décrit précédemment. Les astrocytes des souris 3xTg-AD+L couvrent un territoire similaire aux souris contrôles (Figure III.16 ; $\bar{x}_{WT}$=108 494 ± 7 470 µm^3, $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD}$=56 903 ± 5 960 µm^3, $\bar{x}_{WT+L}$=94 218 ± 11 700 µm^3, $\bar{x}_{3xTg\text{-}AD+L}$=87 370 ± 5 684 µm^3). Le régime enrichi en L-sérine permet de restaurer la taille des astrocytes au niveau de celle des souris contrôles.

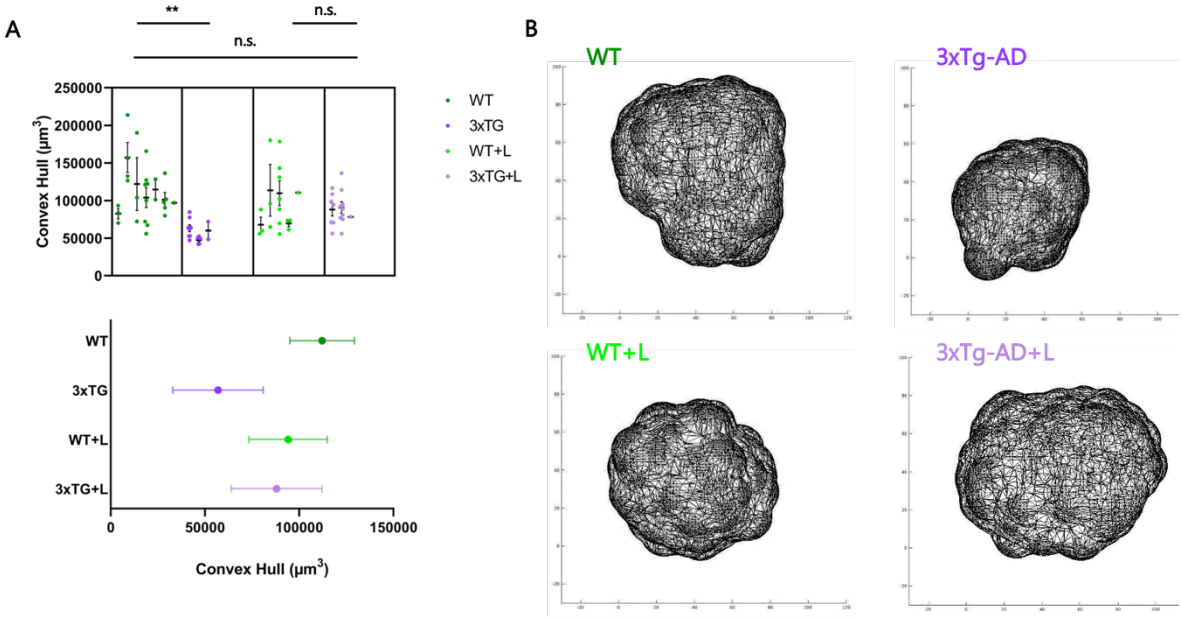


Figure III.16 – La supplémentation chronique en L-sérine restaure le territoire couvert par les astrocytes des souris 3xTg-AD au niveau de celui des souris contrôles. A - Analyse convex hull du territoire couvert par les astrocytes. **B -** Représentation des analyses convex hull. Les astrocytes des souris 3xTg-AD couvrent un territoire similaire à celui des animaux contrôles. Nested 1-way ANOVA ; n=3-6 ; ******, p<0.01 ; **n.s.**, non significatif.

CHAPITRE IV
DISCUSSION

DISCUSSION 119

1. LA BIOSYNTHÈSE DE L-SÉRINE DANS LE CERVEAU 121

1.1. LA L-SÉRINE EST PRODUITE PAR LES CELLULES GLIALES 121
1.2. LA PRODUCTION DE L-SÉRINE EST IMPACTÉE PAR LA MALADIE D'ALZHEIMER 122

2. LE MODÈLE MURIN 3XTG-AD POUR L'ÉTUDE DU PP DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER 124

2.1. LA PRODUCTION DE L-SÉRINE EST DIMINUÉE DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS 3XTG-AD 124
2.2. L'IMPLICATION DE LA L-SÉRINE DANS LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE 126
2.2.1. Les astrocytes 126
2.2.2. Les synapses et leur couverture astrocytaire 127

3. LE POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DE LA L-SÉRINE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER 130

3.1. LA SUPPLÉMENTATION EN L-SÉRINE EST BÉNÉFIQUE POUR LES SOURIS 3XTG-AD 130
3.2. INTERACTIONS ENTRE Aβ, TAU ET LA BIOSYNTHÈSE DE SÉRINE 130
3.3. LA PRISE DE L-SÉRINE POUR LES PATIENTS & LA NÉCESSITÉ DE DÉVELOPPER DE NOUVELLES MÉTHODES DE MESURE DE LA L- ET D-SÉRINE 131

4. LIMITES DE L'ÉTUDE 132

5. CONCLUSION 133

6. PERSPECTIVES 133

1. LA BIOSYNTHESE DE L-SERINE DANS LE CERVEAU

La L-sérine est une brique élémentaire de la synthèse de nombreuses molécules (acides aminés, lipides, nucléotides, SAM, …). C'est la raison pour laquelle sa voie de biosynthèse, le PP, ainsi que les mécanismes de sa régulation sont beaucoup étudiés dans le domaine de l'oncologie. A l'heure actuelle très peu d'informations sont disponibles concernant le cerveau. Dans le cadre de notre projet, nous avons caractérisé le PP dans le cerveau en conditions physiologiques et dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

1.1. LA L-SERINE EST PRODUITE PAR LES CELLULES GLIALES

La L-sérine est synthétisée *de novo* à partir du 3PG, un intermédiaire glycolytique, via le PP. Le groupe de Shigeki Furuya au Japon a été le premier à étudier cette voie dans le cerveau. A partir d'hybridation *in situ* et de marquages immunohistologiques (après avoir développé leur propre anticorps polyclonal), ils ont montré que la PHGDH est préférentiellement exprimée par les cellules souches neuro-épithéliales durant le développement. Après la neurogenèse, les neurones perdent la capacité d'exprimer la PHGDH et celle-ci n'est conservée que par les cellules gliales dans le cerveau des souris [192]. En générant des souris déficientes pour la PHGDH, ils ont également montré que le PP est essentiel pour le développement embryonnaire, et particulièrement pour la morphogenèse du cerveau [190]. Hormis ces travaux, et les récentes bases de données transcriptomiques [16], [18], la caractérisation du PP dans le SNC, et en particulier chez l'humain, n'a pas été réalisée plus en profondeur.

Notre étude confirme et prolonge les résultats de l'équipe de Furuya. Nous avons mis en évidence l'expression préférentiellement astrocytaire de *Phgdh*, *Psat1* et *Psph in vitro* par RT-qPCR chez la souris. La mise en co-culture des astrocytes avec les neurones n'influe pas sur la transcription des gènes du PP. Ces résultats suggèrent que les neurones ne libèrent pas de facteurs influant sur la production astrocytaire de L-sérine.

Nous avons également mis en évidence, par immunohistochimie, l'expression préférentielle de PHGDH[68] et PSAT1 dans les astrocytes de l'hippocampe chez la souris, le primate non-humain et l'humain. Le fait que les astrocytes soient responsables de la production de L-sérine est cohérent avec le fait qu'ils soient capables de réguler leur flux glycolytique.

En accord avec les bases de données transcriptomiques, *PSAT1* est également exprimé par les oligodendrocytes, suggérant que le PP puisse également y être actif, notamment pour la synthèse de myéline. Le fait que notre anticorps ne révèle pas la PHGDH dans les oligodendrocytes pourrait être expliqué par un niveau d'expression oligodendrocytaire faible de *PHGDH*. Nous n'avons pas été capable de révéler la PSPH dans le cerveau avec les différents anticorps que nous avons utilisés. A ce jour, seulement une publication a mis en évidence PSPH par immunohistochimie dans le cerveau de souris, où elle est exprimée par les progéniteurs neuronaux périventriculaires et les cellules souches neurales (cellules prolifératrices) [269]. L'étude du PP dans les oligodendrocytes n'a pas été abordée dans ce projet, mais il serait intéressant de relever leur contribution à la biodisponibilité en L-sérine.

[68] PHGDH apparaît d'ailleurs comme un excellent marqueur d'identité astrocytaire dans le cerveau.

Nos résultats mettent en avant la conservation de l'expression gliale et non neuronale des enzymes du PP à travers différentes espèces, dont l'être humain. Ceci suggère que les données obtenues chez la souris sont en partie extrapolables à l'être humain et valide donc l'utilisation de notre modèle. De plus, l'expression gliale et non neuronale est également conservée *in vitro*, rendant les cultures primaires de cellules murines adéquate à l'étude du PP.

Le caractère exclusivement glial du PP suggère une coopération métabolique supplémentaire entre neurones et cellules gliales. Notre étude sous-entend l'existence d'une navette L-sérine entre astrocytes et neurones afin de répondre aux besoins de ces derniers. Les systèmes de transport ASCT1 (astrocytes) et Asc1 (neurones) semblent être les plus propices à de tels échanges [63]–[65].

1.2. La production de L-serine est impactee par la maladie d'Alzheimer

Le métabolisme du glucose dans le cerveau est altéré de façon précoce dans la maladie d'Alzheimer, via notamment une diminution de la consommation de glucose dans certaines régions corticales et l'hippocampe jusqu'à 20 avant l'apparition des symptômes [113], [152], [270]. Récemment, une étude s'est intéressée aux changements de concentration de métabolites dans le LCR de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [271]. Parmi 122 métabolites analysés, seuls 5 sont significativement diminués dans le LCR des patients. Ces 5 métabolites sont tous des intermédiaires glycolytiques et incluent le 3PG, précurseur de la L-sérine. Encore plus récemment, la plus grande analyse protéomique du cerveau et du LCR de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a été conduite [272]. Les auteurs ont mis en évidence une relation étroite entre l'augmentation précoce (durant la phase asymptomatique) dans le LCR de protéines associées au métabolisme astrocytaire du glucose et à la réponse anti-inflammatoire microgliale avec le risque de développer la maladie d'Alzheimer. La plupart de ces protéines est impliquée dans la glycolyse (PKM, LDH, GAPDH). Ensemble, ces études suggèrent un rôle prépondérant du métabolisme du glucose astrocytaire (principalement glycolytique) dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

Puisque la glycolyse est une source de carbone pour la synthèse de la L-sérine, il est probable qu'une réduction du flux glycolytique et des concentrations en intermédiaires glycolytiques puissent altérer sa synthèse. Cependant, l'altération éventuelle des concentrations de L- et D-sérine dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer est largement débattue. Les analyses biochimiques présentent des résultats contradictoires et ne permettent pas de conclure sur l'évolution des niveaux de L- et D-sérine ni sur leur potentialité à devenir des biomarqueurs de la maladie. Par exemple, Madeira *et al.* ont montré en 2015 une augmentation de la concentration en D-sérine extracellulaire dans l'hippocampe et le LCR de patients ainsi que dans l'hippocampe de modèles rongeurs [273]. Les auteurs suggèrent que cette augmentation de D-sérine puisse être utilisée comme biomarqueur précoce de la maladie d'Alzheimer. Au contraire, Biemans *et al.* n'ont montré aucune différence de concentration en D-sérine dans le LCR issu de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et contrôles [274]. Plusieurs facteurs peuvent justifier ces résultats non conclusifs, comme les méthodes d'analyse utilisées, l'hétérogénéité des stades de sévérité, la petite taille des échantillons ou l'obtention du LCR par ponction lombaire (loin des régions affectées). Une modification des

concentrations en L- et D-sérine pouvant altérer la plasticité du cerveau, il est primordial de clarifier si et quand les concentrations en L- et D-sérine sont altérées dans la maladie d'Alzheimer.

Récemment, une étude s'est intéressée aux ARN extracellulaires circulants (exRNA)[69] comme potentiels biomarqueurs de maladie d'Alzheimer **[275]**. Les auteurs n'ont trouvé qu'un seul gène dont la concentration en exRNA varie dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit de *PHGDH*, dont la concentration augmente de façon précoce (durant la phase asymptomatique) dans le plasma de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. A noter que dans la maladie d'Alzheimer, l'intégrité de la BHE est compromise **[276], [277]**, ce qui peut influer sur les concentrations d'exRNA présents dans le plasma. Ces résultats suggèrent que la quantification des exRNA de *PHGDH* peut être prometteuse pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer.

A l'heure actuelle, le métabolisme de la L-sérine dans le contexte de la maladie d'Alzheimer n'a que très peu été étudié[70]. Pour cette raison, nous avons caractérisé, comme première approche, l'expression de PHGDH et PSAT1 dans le cerveau de patients atteints de formes modérée et sévère de la maladie d'Alzheimer. Nous avons observé une diminution de l'expression de PHGDH qui s'accroît avec la sévérité de la pathologie ainsi qu'une augmentation de l'expression de PSAT1, indépendante de la sévérité. Le niveau d'expression de l'actine est identique, signifiant que les altérations mises en avant ne sont pas dues à l'intégrité des échantillons. Le protéome de l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a été publié par Hondius *et al.* en 2016 **[155]**. Ils mettent en avant une augmentation de l'expression de PHGDH au stade VI et de PSAT1 à partir du stade III de Braak. Ces différences pourraient s'expliquer du fait que nous n'avons pas utilisé exactement les mêmes régions du cerveau pour notre étude (voir chapitre II section 4.1). Il est envisageable que la diminution de l'expression de *PHGDH* que nous avons relevée dans l'hippocampe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, soit due à une fuite des ARN messagers de *PHGDH*, que l'on retrouve comme exRNA dans le plasma des patients.

L'altération de l'expression des enzymes du PP suggère que la synthèse de L-sérine pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, mais ces données préliminaires nécessitent des validations à plus larges échelles.

---

[69] Découverts en 2002 **[322]**, les exRNA sont des ARN (messagers, de transfert, … seuls les ARN ribosomaux semblent ne pas être concernés **[323], [324]**) chargés dans des exosomes ou transportés par des complexes lipoprotéiques ou ribonucléoprotéiques dans le système circulatoire. Dans le cerveau, ils rejoignent le flux sanguin via le système lymphatique ou la BHE. Leurs fonctions biologiques sont encore peu connues mais ils semblent être une forme de communication et régulation intercellulaire **[324], [325]**.

[70] Seulement 4 résultats PubMed pour la recherche *« (((alzheimer's disease [All Fields]) AND ((phgdh [All Fields]) OR (psat1 [All Fields]) OR (psph [All Fields])))* », dont le nôtre **[175]**, en juillet 2020.

2. Le modele murin 3xTg-AD pour l'etude du PP dans la maladie d'Alzheimer

Les résultats obtenus par nos collaborateurs Aude Panatier et Stéphane Oliet indiquent que la LTP est altérée dans le modèle murin 3xTg-AD et que celle-ci peut être restaurée par la D-sérine [175]. Nous avons alors décidé d'utiliser ce modèle murin pour étudier l'implication du PP dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Les souris 3xTg-AD ont été créées en injectant les 2 transgènes humains mutés (*MAPT* P301L et *APP Swedish*) sous contrôle du promoteur neuronal Thy1 dans des embryons *knock-in PSEN1 M146V* ubiquitaire. Les transgènes se sont insérés au même endroit du chromosome 2. Depuis la publication originale [167], de nombreuses études ont utilisé cette lignée 3xTg-AD[71], mais des données indiquent que le phénotype de ces souris 3xTg-AD a changé au fil des ans et des rapports contradictoires sur l'apparition de la pathologie ou des déficits cognitifs sont apparents dans la littérature. Un travail récent réalisé par Salvatore Oddo montre une progression cohérente et prévisible de la pathologie chez les souris femelles 3xTg-AD [278] de façon similaire à ce que nous avons rapporté dans notre cohorte élevée au laboratoire [175]. En terme d'expression cellulaire des 2 transgènes (Tau et App), il est difficile d'obtenir des informations solides démontrant que l'expression de ces 2 protéines est uniquement restreinte aux neurones. Quant à PSEN1, hormis son rôle prépondérant dans le clivage de l'APP, cette protéine interfère avec l'homéostasie calcique des astrocytes [279]. La signalisation calcique des astrocytes participe à de nombreuses fonctions cellulaires, encore peu comprises, mais dont la perturbation entraîne des conséquences dramatiques à la fois sur le métabolisme astrocytaire et la physiologie du cerveau [280].

2.1. La production de L-serine est diminuee dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD

Nous avons quantifié les niveaux de plusieurs acides aminés dans le cerveau des souris 3xTg-AD à 6 mois par LC-MS/MS après microdialyse de l'hippocampe. Les résultats montrent une diminution des concentrations extracellulaires en L-sérine (-54%) et D-sérine (-36%) dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD, comparé aux souris contrôles. Nous avons réalisé ces mesures des concentrations extracellulaires de L- et D-sérine dans l'hippocampe de souris vigiles pendant 24 h, permettant l'analyse des concentrations sur un cycle veille-sommeil. Cette fraction extracellulaire représente une mesure plus pertinente que la fraction totale et donne une indication des taux de L- et D-sérine qui sont à proximité immédiate des synapses. Bien que l'origine astrocytaire de la L-sérine soit très vraisemblable, nous n'avons pas d'indication sur l'origine cellulaire de la D-sérine ; astrocytes ou neurones, le sujet est toujours très débattu [60]–[62], [64]. Quoi qu'il en soit, la présence de ces 2 acides aminés dans le milieu extracellulaire confirme l'existence de transporteurs cellulaires dont les identités sont encore à caractériser [281].

En 2017, Papouin *et al.* ont mis en évidence que la concentration en D-sérine dépend de l'état d'éveil de l'animal [282]. Par microdialyse et enregistrement vidéo des animaux, ils ont montré que lorsque l'animal dort, la concentration en D-sérine

[71] 685 résultats PubMed pour la recherche (*3xtg-ad[All Fields])* en juillet 2020.

extracellulaire est plus faible dans l'hippocampe (0.5 µM), alors qu'elle est plus élevée (3 µM) lorsque l'animal est éveillé. La L-sérine ne semble pas fluctuer de la même manière. Nous n'avons pas observé de telles variations en fonction du cycle jour/nuit ; nous avons mesuré une valeur moyenne de 4.5 µM, correspondant à un état d'éveil. Nous n'avons pas monitoré l'activité de nos animaux pendant la microdialyse et Papouin *et al.* ont utilisé des souris mâles C57BL/6J alors que nous avons réalisé nos expériences de microdialyse sur des souris femelles B6129SF2/J et 3xTg-AD.

Parmi les nombreuses explications permettant de rendre compte d'une moindre quantité de L- et D-sérine dans l'espace extracellulaire des souris 3xTG-AD, nous avons testé celle d'une altération fonctionnelle du PP. Pour ce faire, nous nous sommes attachés à quantifier l'expression de PHGDH dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD et contrôles à 6, 12 et 18 mois. Nos données montrent qu'il n'y a pas de perte d'expression globale significative mais que la distribution de l'expression cellulaire de la PHGDH au sein de la population astrocytaire semble affectée. Ainsi, les souris 3xTg-AD possèdent une plus grande proportion d'astrocytes exprimant faiblement la PHGDH dans l'hippocampe, comparé aux souris contrôles. Cette analyse semi-quantitative suggère que le PP pourrait être affecté localement au cours de l'apparition des marques anatomopathologiques avec le temps, par des mécanismes encore à définir. Il faudrait analyser de façon corrélative et spatiale l'expression de la PHGDH avec l'expression d'Aβ intracellulaire ou des plaques séniles.

L'autre hypothèse, non exclusive, serait que l'altération du métabolisme du glucose dans l'hippocampe de ces souris induit une diminution de substrat (3PG) disponible pour alimenter le flux du PP. Afin de déterminer si la diminution de la synthèse de L- et D-sérine est due à l'hypométabolisme glycolytique que nous avons mesuré dans l'hippocampe de ces souris, nous avons également réalisé des microdialyses dans le cortex frontal[72] des souris 3xTg-AD et contrôles. Nous sommes actuellement dans l'attente des résultats de dosage. Si aucune différence de concentration extracellulaire en L- et D-sérine n'est relevée, cela confirmerait l'implication de l'hypométabolisme dans la diminution de la biodisponibilité en L-sérine. Concernant le glutamate, dont la synthèse *de novo* dérive également du métabolisme du glucose puisqu'elle nécessite l'α-KG, produit par le cycle de Krebs, il n'est pas surprenant que sa concentration extracellulaire ne soit pas impactée. Une fois produit, le glutamate est en permanence recyclé via le couplage métabolique entre astrocytes et neurones (voir chapitre I section 2.1.2), permettant de s'affranchir d'une nouvelle synthèse *de novo* à partir de la glycolyse. Néanmoins, le recyclage du glutamate nécessite de l'ATP, suggérant qu'une diminution plus importante du métabolisme énergétique pourrait avoir des conséquences dramatiques sur la concentration en glutamate dans le cerveau [283].

De telles altérations concernant le métabolisme de la sérine ont également été retrouvées dans d'autres modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer, notamment concernant la diminution des niveaux extracellulaires de D-sérine [284] ou les changements d'expression des transcrits du PP [285], [286]. Ceci supporte l'idée que des déficits en synthèse de sérine puissent participer à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer [272].

[72] Région où aucun cluster hypométabolique n'a été repéré chez les souris 3xTg-AD [175].

2.2. L'IMPLICATION DE LA L-SERINE DANS LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE

La L-sérine est un précurseur obligatoire des sphingolipides et de la phosphatidylsérine. La synthèse des phospholipides est dépendante du métabolisme du glucose, puisqu'elle nécessite le dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire glycolytique, comme substrat [287]. Ces lipides se retrouvent notamment dans la composition des membranes plasmiques, c'est pourquoi nous avons voulu vérifier si la diminution de la biodisponibilité en L-sérine et/ou glucose avait un impact sur la morphologie des cellules. Zhu *et al.* ont montré en 2015 une diminution des phospholipides dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Celle-ci est accentuée chez les porteurs d'*APOEε4* [288]. D'autres évidences *in vitro* montrent également une altération du métabolisme des phospholipides dans la maladie d'Alzheimer [289], et l'inhibition de la synaptojanine[73] s'est révélée bénéfique dans différents modèles murins de la maladie d'Alzheimer [290], [291].

2.2.1. LES ASTROCYTES

Nous avons mis en évidence une diminution de presque la moitié du volume couvert par les astrocytes de la région CA1 de l'hippocampe des souris 3xTg-AD, comparé aux contrôles. Les valeurs de convex hull que nous avons obtenues pour le volume couvert par les astrocytes des animaux contrôles est en accord avec les valeurs de la littérature (volume compris entre 50 000 et 120 000 μm^3) [292]. Peu d'études se sont intéressées à la taille des astrocytes dans l'hippocampe de ce modèle. Olabarria *et al.* ont montré une diminution de la taille du cytosquelette des astrocytes à partir du marquage GFAP [170]. La diminution la plus flagrante concerne le hilus, région que nous n'avons pas étudiée dans ce projet. Dans la région CA1, la différence de taille n'est significative qu'à partir de 18 mois et d'un ordre de grandeur inférieur à ce que nous avons mesuré (33%). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences. Nous avons conduit une étude en 3D, alors que les analyses morphométriques basées sur le marquage GFAP sont restreintes à une analyse 2D. Le remplissage de cytoplasme par une protéine fluorescente permet de visualiser l'astrocyte jusqu'à la limite de diffraction du microscope, alors que la GFAP ne révèle que le cytosquelette principal. Ces différences expérimentales peuvent expliquer pourquoi nous décelons des différences significatives dans CA1 plus tôt (dès 6 mois) que Olabarria et collègues. Leur étude montre également qu'il n'y a pas de différence en terme de densité d'astrocytes GFAP+ entre souris 3xTg-AD et contrôles dans l'hippocampe.

Le régime enrichi en L-sérine permet de restaurer la taille des astrocytes des souris 3xTg-AD au niveau de celle des souris contrôles. Chez les souris contrôles, l'augmentation de la biodisponibilité en L-sérine n'influe pas sur la taille de leurs astrocytes. Ces résultats suggèrent que la diminution initiale du volume serait due au manque de biodisponibilité en L-sérine. Il serait intéressant d'analyser la composition lipidique de la membrane des astrocytes. En effet, il a été rapporté *in vitro* que la privation de L-sérine entraîne l'apparition d'un phospholipide inhabituel, la phosphatidyl-L-thréonine [293].

[73] La synaptojanine est une enzyme responsable de la dégradation du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate.

2.2.2. LES SYNAPSES ET LEUR COUVERTURE ASTROCYTAIRE

Nous avons évalué la densité des éléments composants les synapses (boutons synaptiques et épines dendritiques) par microscopie confocale et celle des synapses par microscopie électronique dans notre modèle murin 3xTg-AD. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les animaux contrôles et 3xTg-AD concernant les boutons et épines dendritiques. Les différents types d'épines dendritiques existent sur un *continuum* de morphologies (Figure IV.1) et sont très dynamiques. Ainsi, une quantification des différents types d'épines réalisée à un seul temps, à partir d'images issues d'un microscope confocal ne permet pas d'établir de conclusion définitive.

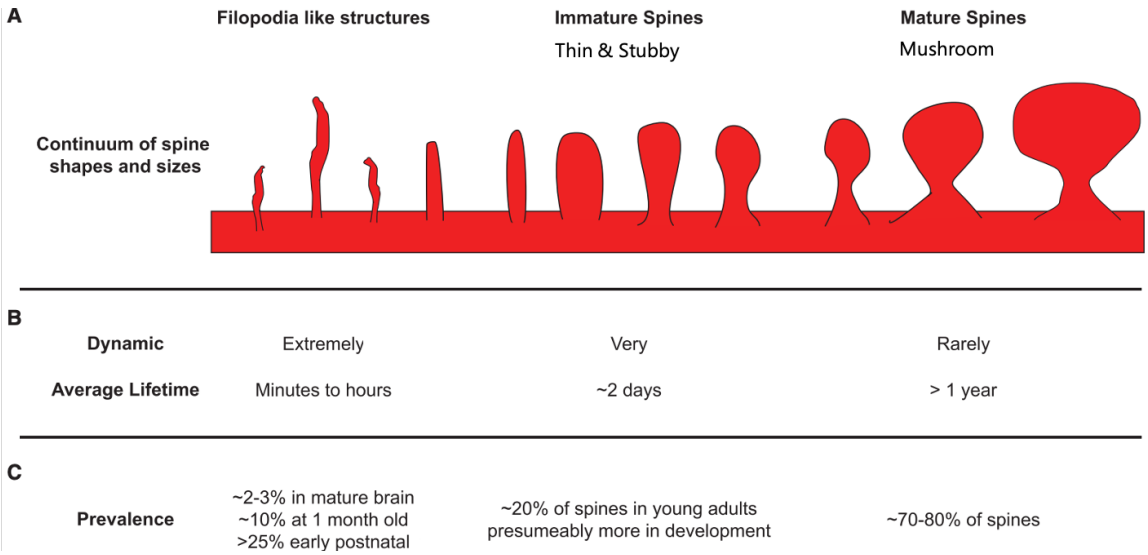


Figure IV.1 – Les épines dendritiques existent sur un *continuum* de morphologies allant des structures filopodiales au épines larges et matures, adaptée de [294]. **A -** Diagramme montrant le *continuum* de morphologies. Les épines dendritiques peuvent être groupées en trois catégories : structures filipodiales, épines immatures et épines matures. **B -** Dynamisme des catégories d'épines. **C -** Prévalence pour chaque type d'épines. A l'âge adulte, la majorité des épines (80%) est mature et forme une synapse.

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à la densité des éléments synaptiques dans la région CA1 du modèle murin 3xTg-AD [295]. Cette analyse montre une diminution de la densité totale des épines, qui est due à la diminution des épines de type *mushroom*. Néanmoins, la densité mesurée sur les animaux contrôles (4 épines.µm^{-2}) est bien supérieure à la nôtre (1.6 épines.µm^{-2}) et à celles d'autres modèles murins de la maladie d'Alzheimer (voir Table IV.1). Ceci peut s'expliquer par leur technique de remplissage individuel des neurones à l'aide du *Lucifer Yellow*, cumulée à l'application d'un faible courant électrique pour permettre le remplissage complet de l'arborisation dendritique.

L'analyse des épines dendritiques dans différents modèles murins de la maladie d'Alzheimer tend à montrer une diminution des épines de type *mushroom*, les plus stables et propices à former une synapse (voir Table IV.1). La diminution de ce type d'épines pourrait rendre compte de l'apparition des déficits cognitifs. Néanmoins, il faut noter les variabilités observées entre les différents modèles murins. De façon à s'affranchir de ces

limites expérimentales, nous avons décidé d'évaluer la densité synaptique par microscopie électronique.

A 6 mois, nous n'avons pas mis en évidence de différences de densité synaptique (excitatrice et inhibitrice) dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD par rapport aux souris contrôles. Ce résultat est cohérent avec le fait qu'il n'y a pas de mort neuronale [173] ni de diminution du volume de l'hippocampe à cet âge [175]. Compte tenu de la diminution du volume des astrocytes, nous avons également cherché à évaluer la couverture astrocytaire de ces synapses. Pour ce faire, les synapses ont été classées en 3 catégories, en fonction de leur(s) contact(s) avec un astrocyte, comme cela a déjà pu être fait [296], [297]. La répartition des différentes classes de synapses dans l'hippocampe que nous avons obtenue est cohérente avec celle rapportée dans les articles précédemment mentionnés. Nous nous attendions à voir une augmentation de la proportion de synapses de classe 1 (sans contact astrocytaire) chez les souris 3xTg-AD, ce qui n'a pas été le cas. En effet, nous pensions que la diminution du territoire couvert par les astrocytes des souris 3xTg-AD aurait des répercussions sur la couverture astrocytaire. La possibilité que la diminution du volume astrocytaire soit compensée par une augmentation du nombre d'astrocytes est à considérer. Enfin, il est envisageable que notre technique de marquage des astrocytes (injection d'un AAV-GFP dans le système sanguin) ne cible pas les mêmes populations astrocytaires entre les animaux contrôles et 3xTg-AD. En effet, l'intégrité de la BHE dans le modèle 3xTg-AD est compromise [298], [299]. Cumulé au petit nombre d'astrocytes reconstruits par animaux, il se pourrait que nos reconstructions ne soient pas représentatives de la population astrocytaire de l'hippocampe.

Index	Étude	Modèle animal	Structure	Sous-structure	Densité de référence (nbr.µm^{-2})	Évolution de la densité dans le modèle de la maladie d'Alzheimer			
						Totale	*Thin*	*Stubby*	*Mushroom*
[295]	Chakroborty 2019	3xTg-AD	Hippocampe	CA1	4	↓	---	---	↓
[300]	Spires 2005	Tg2576 APP	Cortex	Plaques séniles	0.4	↓	---	---	---
[301]	Perez-Cruz 2011	Tg2576 APP	Hippocampe	CA1 Basal proximal	1.25	↓	N/A	N/A	↓
				CA1 Basal distal		---	N/A	N/A	---
				CA1 Apical proximal		---	N/A	N/A	---
				CA1 Apical distal		---	N/A	N/A	---
		APP/Lo		CA1 Basal proximal		↓	N/A	N/A	↓
				CA1 Basal distal		↓	N/A	N/A	↓
				CA1 Apical proximal		---	N/A	N/A	---
				CA1 Apical distal		---	N/A	N/A	---
[302]	Wu 2010	Tg2576 APP	Culture primaire de neurones corticaux		0.5	↓	N/A	N/A	N/A
[303]	Zhang 2015	APPKI 3 mois	Hippocampe	CA1	1.6	---	↑	---	↓
		APPKI 6 mois			1.2	↑	↑	↑	↓

Table IV.1 – Tableau comparatif de la littérature de la densité des épines dendritiques dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer. La densité de référence correspond à la valeur mesurée dans leurs contrôles. ↓, diminution ; ↑, augmentation ; **---**, pas de changement ; **N/A**, non mesurée

3. Le potentiel therapeutique de la L-serine dans la maladie d'Alzheimer

3.1. La supplementation en L-serine est benefique pour les souris 3xTg-AD

Notre étude a mis en évidence une diminution de la biodisponibilité en L-sérine dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD. Cette altération du métabolisme de la sérine se traduit par l'apparition de déficits cognitifs chez la souris 3xTg-AD. Le régime enrichi en L-sérine permet de restaurer à la fois les capacités de mémoire spatiale de ces animaux, les troubles électrophysiologiques [175] ainsi que la diminution du volume des astrocytes. Notre équipe a également montré que l'inhibition de la PHGDH par stratégie Cre/Lox dans le cerveau de souris *Phgdh*$^{Flox/Flox}$ génère les mêmes déficits cognitifs que ceux des souris 3xTg-AD, déficits restaurés par la L-sérine [175]. Tout ceci suggère que la synthèse de L-sérine est importante pour la formation de la mémoire.

3.2. Interactions entre Aβ, Tau et la biosynthese de serine

Nos résultats suggèrent que la synthèse de L-sérine est nécessaire pour la formation de la mémoire à long-terme et que sa supplémentation à travers la nourriture est capable de restaurer les capacités mnésiques des souris 3xTg-AD. Cet effet bénéfique semble être en partie dû à l'augmentation de la concentration extracellulaire en D-sérine et possiblement à la restauration de la taille des astrocytes de l'hippocampe. Nous ne savons pas si l'altération du métabolisme de la sérine et si les effets bénéfiques de sa supplémentation sont spécifiques de la maladie d'Alzheimer. En effet, l'hypométabolisme du glucose est un caractère commun aux maladies neurodégénératives [304], [305]. Afin de déterminer si la biosynthèse de la L-sérine est spécifiquement impliquée dans la maladie d'Alzheimer, il est nécessaire de déterminer si Aβ, Tau et le PP interagissent.

Il a été montré que la diminution de la concentration en D-sérine chez des souris invalidées pour le gène codant pour la SR atténue la toxicité induite par les fragments Aβ [306]. Inversement, l'application d'Aβ sur des cultures de neurones hippocampiques entraîne une augmentation de la concentration en D-sérine [273]. Sur des cultures d'astrocytes, elle impacte les niveaux de NADH [307] et la signalisation calcique [308]. Ces résultats suggèrent que l'Aβ pourrait altérer la production et/ou le transport de la sérine. Il serait intéressant d'évaluer l'activité du PP lors de l'application d'Aβ *in vitro* pour déterminer à la fois l'impact sur la biosynthèse de L-sérine et les mécanismes sous-jacents. L'utilisation d'inhibiteurs du métabolisme énergétique ou de PHGDH [231], [309], combinée à des milieux de culture avec ou sans sérine serait intéressante pour étudier les éventuelles interactions entre la biosynthèse de L-sérine et l'accumulation de l'Aβ ou de Tau.

Nous n'avons pas encore évalué l'effet de la supplémentation en L-sérine sur les caractéristiques anatomopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Pour ce faire, des souris 3xTg-AD âgées de 4 mois suivent actuellement le régime enrichi en L-sérine pendant plusieurs mois. Nous prévoyons de réaliser des marquages immunohistologiques ciblant les plaques séniles afin de mesurer leur nombre et leur surface. Selon le décours de la maladie dans ce modèle murin, la même expérience devrait être répétée à un stade plus avancé et ciblant la protéine Tau afin d'évaluer l'effet de la L-sérine sur la pathologie Tau. Ces résultats apporteront

une première information quant au potentiel effet de la L-sérine sur la régulation de l'accumulation de l'Aβ et de Tau.

3.3. LA PRISE DE L-SERINE POUR LES PATIENTS & LA NECESSITE DE DEVELOPPER DE NOUVELLES METHODES DE MESURE DE LA L- ET D-SERINE

La supplémentation en L-sérine dans les pathologies génétiques et neurodégénératives a été largement détaillée au chapitre I section 4.3.

L'utilisation de L- ou D-sérine comme traitement de la maladie d'Alzheimer peut être perçue comme contre-intuitive. En effet, la sur-activation des récepteurs NMDA ainsi que l'excitotoxicité et la mort neuronale consécutives sont des hypothèses suivies depuis longtemps dans le contexte de la maladie d'Alzheimer [310] ; elle a ainsi motivé l'utilisation de la Mémantine comme traitement. Cependant, dans la maladie d'Alzheimer, des altérations fonctionnelles débutent des années avant l'apparition des déficits cognitifs et la mort neuronale. Nos résultats ont été obtenus chez des animaux 3xTg-AD jeunes, dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer. Il est envisageable que les déficits en L-sérine soient caractéristiques des premiers stades de la maladie, alors que l'excitotoxicité surviendrait lorsque la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer est déjà avancée. Pour étayer cette hypothèse, il est essentiel de développer des méthodes précises de mesure des concentrations en L- et D-sérine extracellulaires dans le cerveau de patients à différents stades de la maladie. Durant les stades précoces de la maladie, les concentrations de D-sérine sont habituellement mesurées dans le LCR, ce qui apporte une vision globale et non locale des concentrations de ces acides aminés dans le cerveau [273], [274]. Ces limitations expérimentales sont également responsables des résultats contradictoires concernant la potentialité de la D-sérine comme biomarqueur de la maladie (voir section 1.2). Le développement futur de techniques non-invasives de mesure des concentrations en L- et D-sérine dans le cerveau serait un atout majeur pour les études longitudinales et translationnelles. L'équipe de Jean Théberge tente, par exemple, de mettre au point la quantification de la sérine par spectroscopie par résonance magnétique [311].

4. LIMITES DE L'ETUDE

Notre étude présente certaines limites devant être reconnues. Elle a été conduite sur un seul modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Il serait utile de la réaliser sur d'autres modèles afin de déterminer si la diminution en L-sérine extracellulaire dans l'hippocampe est une caractéristique générale de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

Le nombre d'échantillons humains analysés est assez faible, il serait souhaitable de pouvoir l'accroître, ainsi que d'avoir accès à d'autres régions du cerveau.

Les reconstructions 3D d'astrocytes et de synapses ainsi que le comptage et la classification des épines dendritiques ont été réalisées manuellement. De nouvelles méthodes permettent de réaliser une imagerie volumétrique des réseaux synaptiques à large échelle et de s'affranchir des biais dus à l'expérimentateur [312].

L'effet de la supplémentation en L-sérine n'a été étudié qu'à l'âge de 6 mois. Il serait important de vérifier que les effets bénéfiques de la supplémentation en L-sérine sont durables dans le temps.

5. Conclusion

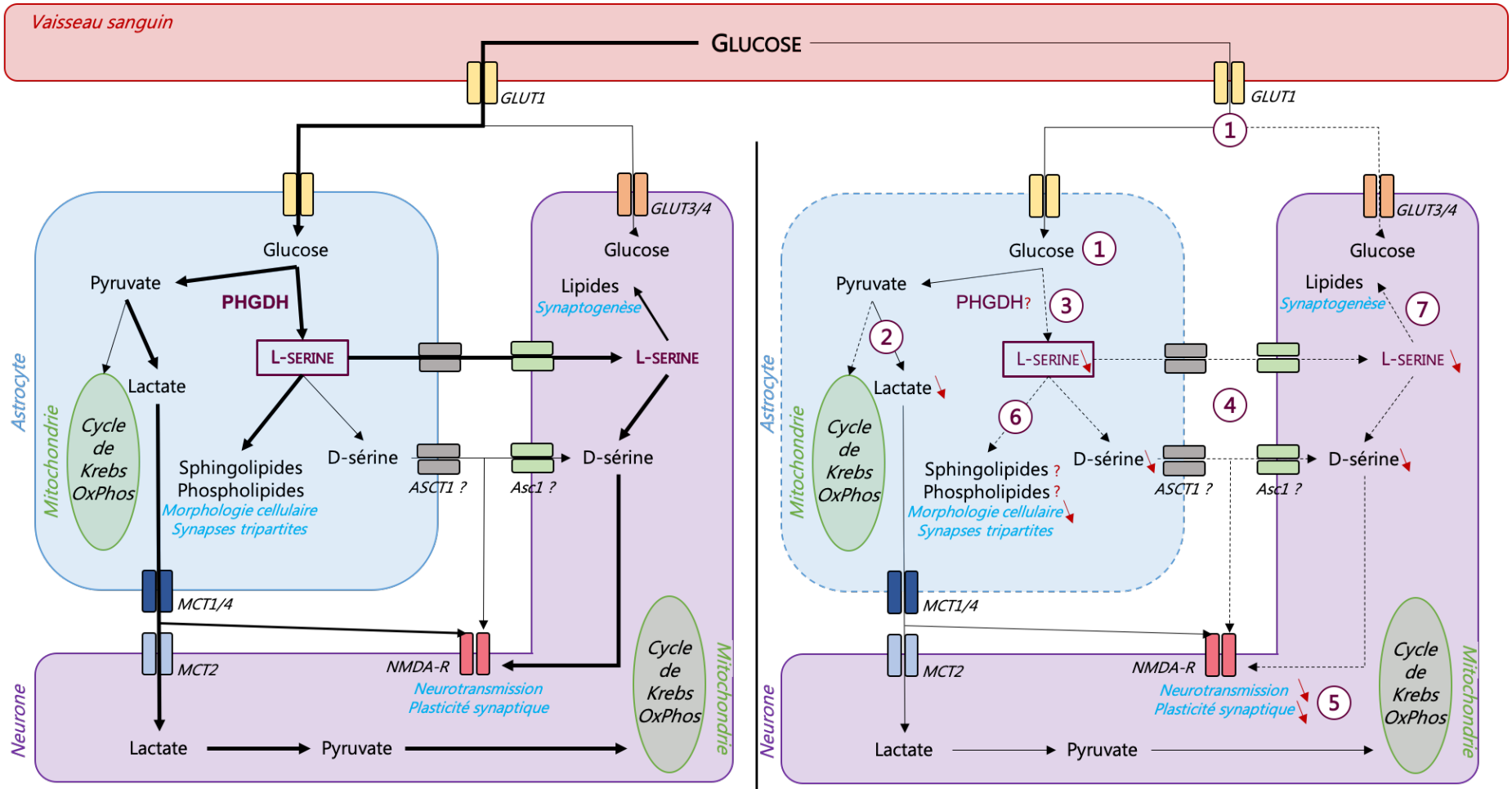
Notre étude est la première à montrer les effets bénéfiques d'une supplémentation en L-sérine dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Un essai clinique est actuellement en cours afin de valider cette option thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (identifiant NCT : 03062449 [313]).

Notre étude place également la L-sérine au centre d'un hub métabolique essentiel à la physiologie du cerveau. Elle met en avant l'intérêt d'étudier le métabolisme de la L-sérine dans les pathologies neurodégénératives et/ou liées au métabolisme du glucose. A côté du lactate, la L-sérine représente une autre molécule de signalisation astrocytaire issue du métabolisme glycolytique.

En se basant sur la littérature et les résultats obtenus lors de ce projet, nous soumettons un schéma récapitulatif du modèle que nous proposons (voir schéma bilan). Ce schéma reprend les différents points abordés et suggère un nouveau lien mécanistique entre le métabolisme énergétique et l'activité synaptique. Notre modèle ne se base pas sur l'altération de la production d'ATP pour expliquer les déficits cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer. Nous émettons l'hypothèse que la diminution du flux glycolytique astrocytaire conduit à une diminution de la production de L-sérine, ayant de multiples conséquences influant sur l'homéostasie cellulaire, la neurotransmission et la plasticité synaptique. De nombreuses expériences sont encore requises pour confirmer notre hypothèse (voir section 6).

6. Perspectives

De nombreuses autres pistes sont encore à suivre pour identifier les mécanismes pouvant rendre compte des effets bénéfiques de la L-sérine. Notamment ceux concernant la production de GSH, d'H_2S, des lipides et l'homéostasie mitochondriale. Il est probable que la diminution de la biodisponibilité en L-sérine dans la maladie d'Alzheimer affecte ces points clefs du métabolisme cellulaire (voir schéma perspectives).



CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

MALADIE D'ALZHEIMER

SCHEMA BILAN :

1 La consommation de glucose est altérée dans l'hippocampe [175].

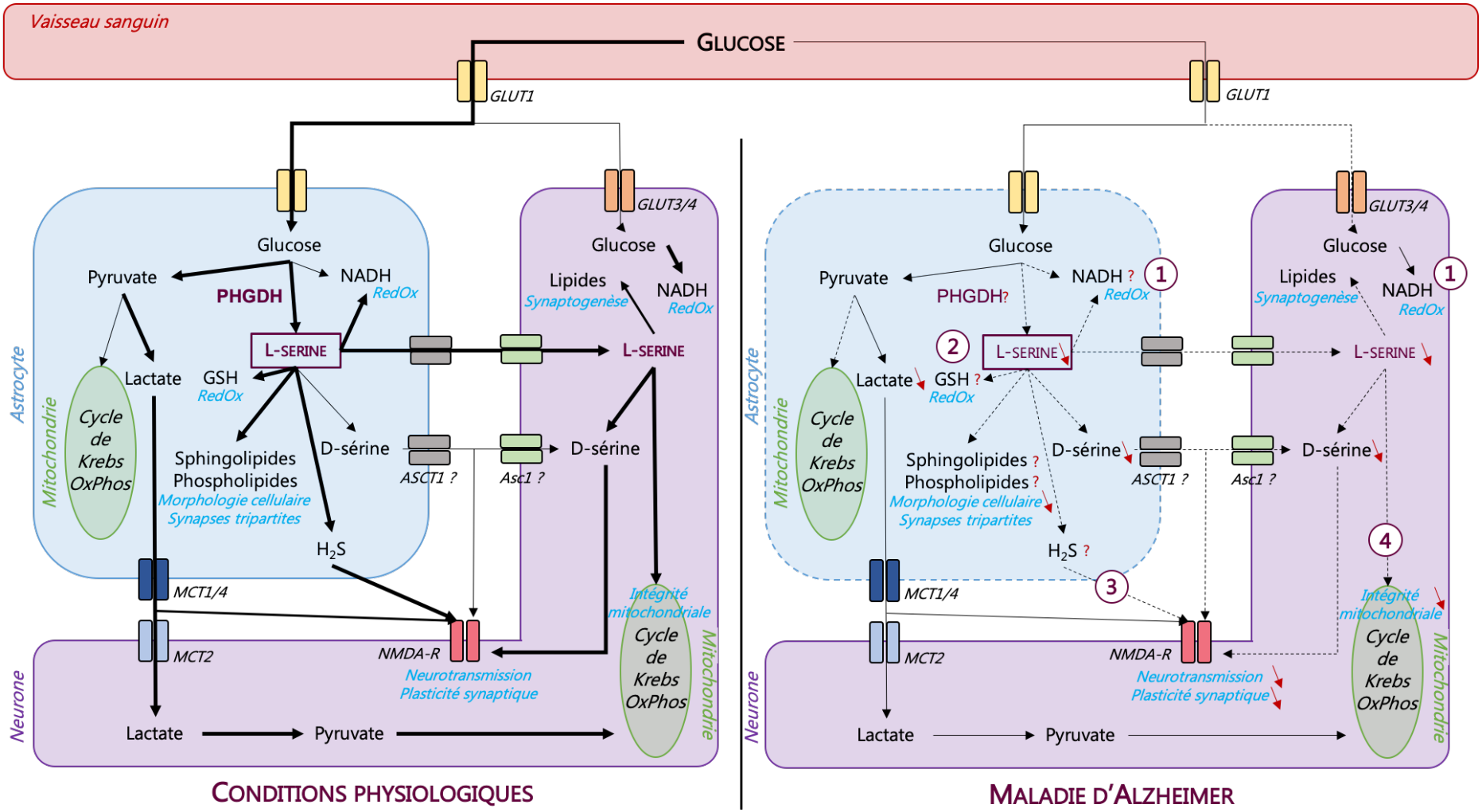
2 La production de lactate est réduite dans les astrocytes de l'hippocampe [175].

3 Le PP est altéré dans les astrocytes humains, possiblement murins.

4 Les concentrations extracellulaires de L- et D-sérine sont diminuées dans l'hippocampe [175].

5 L'hypoactivité NMDA conduit à des déficits cognitifs.

6 La L-sérine impacte la taille des astrocytes mais pas la couverture astrocytaire ni 7 la densité synaptique.



CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

MALADIE D'ALZHEIMER

SCHEMA PERSPECTIVES :

1 & 2 L'homéostasie rédox pourrait être impactée par la diminution de la production de NADH (via la réduction des flux glycolytiques, pentoses phosphates et folate) et de glutathion, nécessitant la L-sérine comme précurseur

3 La diminution de la biodisponibilité en L-sérine pourrait induire une diminution de la production de H_2S, modulant les NMDA-R et la SR [221].

4 La L-sérine est nécessaire à l'intégrité mitochondriale [229]. La diminution de sa biodisponibilité pourrait altérer les voies métaboliques mitochondriales.

CHAPITRE V
ANNEXES & COMMUNICATIONS

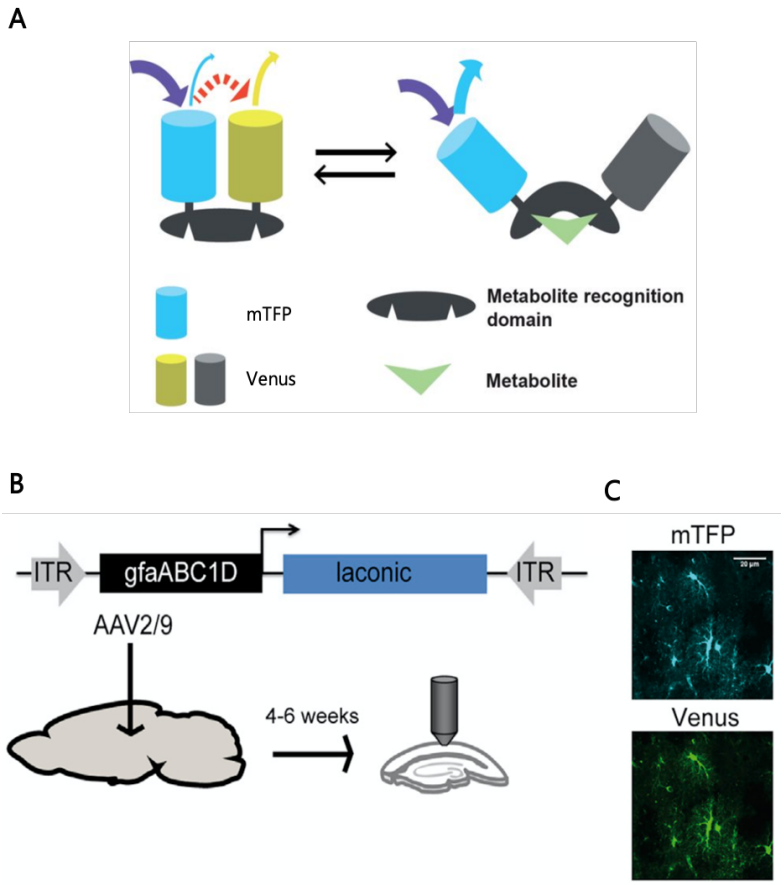
ANNEXES & COMMUNICATIONS 137

ANNEXE 1. FONCTIONNEMENT DES SONDES FRET 139
ANNEXE 2. COMPOSITION DES CROQUETTES ALTROMIN 1324 MODIFIÉES POUR CONTENIR 10% DE L-SÉRINE 141
ANNEXE 3. DÉTAIL DES P-VALUES CONCERNANT LES COMPARAISONS MULTIPLES ET ANALYSES DE DISTRIBUTION 143
COMMUNICATION 1. CHRONIC L-SERINE SUPPLEMENTATION IMPROVES COGNITIVE BEHAVIOR AND LONG-TERM POTENTIATION IN 3XTG-AD MICE, AN ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL 145
COMMUNICATION 2. IMPAIRMENT OF GLYCOLYSIS-DERIVED L-SERINE PRODUCTION IN ASTROCYTES CONTRIBUTES TO COGNITIVE DEFICITS IN ALZHEIMER'S DISEASE 147
COMMUNICATION 3. L-SERINE LINKS METABOLISM WITH NEUROTRANSMISSION 181

ANNEXE 1. FONCTIONNEMENT DES SONDES FRET

Exemple de la sonde FRET *laconic* dont les résultats sont présentés en Figure I.19

Figure adaptée de [175], [314].



Les sondes FRET correspondent à deux fluorophores liés par un *linker* capable de reconnaître spécifiquement un ligand. Lorsque le premier fluorophore (*id est* celui avec la plus basse longueur d'onde d'excitation) est excité, il émet une longueur d'onde capable d'exciter le deuxième fluorophore, qui se met à son tour à émettre. Ce transfert d'énergie n'est réalisable que si les deux fluorophores sont suffisamment proches. Le principe de la sonde FRET réside donc dans la fixation du ligand qui va induire un changement conformationnel de celle-ci et, ainsi, rapprocher ou éloigner les deux fluorophores (**A**). Le ratio de la fluorescence émise par les deux fluorophores permet d'extrapoler la concentration cellulaire du ligand. Malheureusement, surtout *in vivo*, la calibration des sondes FRET reste très ardue et ne permet d'obtenir que des concentrations relatives.

Les sondes FRET ont l'avantage de pouvoir être génétiquement encodées : elles peuvent être constitutives ou délivrées par un vecteur viral. Dans le cas de la sonde *laconic* utilisée par notre équipe, un AAV a été utilisé pour transduire les astrocytes de l'hippocampe des souris. Pour ce faire, la séquence *laconic* est sous le contrôle du promoteur astrocytaire GFAabc1d (**B**) et l'AAV est injecté par stéréotaxie directement dans l'hippocampe. mTFP est excité à 458 nm et émet à 492 nm (bleu) tandis que Venus est excité à 515 nm et émet à 528 nm (vert) (**C**). En présence de lactate, mTFP est éloigné de Venus et émet plus que Vénus. En absence de lactate, mTFP transfert son énergie à Venus qui émet alors plus que mTFP. Ainsi, le calcul du ratio Fluorescence-émise-mTFP/Fluorescence-émise-Venus permet de rendre compte de la concentration intracellulaire relative en lactate.

ANNEXE 2. COMPOSITION DES CROQUETTES ALTROMIN 1324 MODIFIEES POUR CONTENIR 10% DE L-SERINE

ALTROMIN 1324 modified contain 10% L-Serine MAINTENANCE DIET – RATS AND MICE

Rohnährstoffe | Crude Nutrients	[%]
Trockensubstanz | Dry Matter	91.0
Rohprotein | Crude Protein	19.0
Rohfett | Crude Fat	4.0
Rohfaser | Crude Fibre	6.0
Rohasche | Crude Ash	5.9
NfE Stickstoff freie Extraktstoffe | Nitrogen Free Extracts	65.1

Mineralstoffe | Minerals	[%]
Calcium	0.7
Phosphor | Phosphorus	0.5
Magnesium	0.1
Natrium | Sodium	0.2
Kalium | Potassium	0.8

Umsetzbare Energie | Metabolizable Energy	13.9 MJ/kg (2988 kcal/kg)
Kalorien aus Protein | Calories from protein*	22.9 %
Kalorien aus Fett | Calories from fat*	10.9 %
Kalorien aus Kohlenhydraten | Calories from carbohydrates*	66.2 %

(* berechnet mittels Atwater Faktoren | calculated using Atwater factors)

Aminosäuren | Amino Acids [%]	
Alanin | Alanine	0.8
Arginin | Arginine	1.2
Asparaginsäure | Aspartic Acid	1.8
Glutaminsäure | Glutamic Acid	3.6
Glycin | Glycine	0.7
Histidin | Histidine	0.4
Isoleucin | Isoleucine	0.8
Leucin | Leucine	1.4
Lysin | Lysine	0.9
Met + Cyst	0.5
Phenylalanin | Phenylalanine	0.9
Phe + Tyr	1.5
Prolin | Proline	1.1
Serin | Serine	10.8
Threonin | Threonine	0.7
Tryptophan	0.2
Valin | Valine	0.9

Vitamine pro kg | Vitamins per kg	Standard	Fortified
Vitamin A	15.000 IE | IU	25.000 IE | IU
Vitamin D3	600 IE | IU	1.000 IE | IU
Vitamin B1	18 mg	30 mg
Vitamin B2	12 mg	20 mg
Vitamin B6	9 mg	15 mg
Vitamin B12	24 mcg	40 mcg
Vitamin C	36 mg	58 mg
Vitamin K3	3 mg	5 mg
Vitamin E	75 mg	125 mg
Folsäure | Folic Acid	2 mg	3 mg
Biotin	60 mcg	100 mcg
Nikotinsäure | Nicotinic Acid	36 mg	60 mg
Pantothensäure | Pantothenic Acid	21 mg	35 mg
Cholinchlorid | Choline Chloride	600 mg	1.000 mg

Spurenelemente | Trace Elements [ppm]	
Eisen | Iron	154
Mangan | Manganese	44
Zink | Zinc	63
Kupfer | Copper	12
Iod | Iodine	1.3
Selen | Selenium	0.2
Kobalt | Cobalt	0.4

ANNEXE 3. DETAIL DES P-VALUES CONCERNANT LES COMPARAISONS MULTIPLES ET ANALYSES DE DISTRIBUTION

Figure III.1 – Expression relative des ARNm du PP et de la protéine PHGDH dans des cultures et co-cultures primaires d'astrocytes et de neurones.

2-way ANOVA – Comparaison de Tukey	Phgdh	Psat1	Psph	Sr	PHGDH
Astrocytes *vs.* Neurones	0.0003	0.0004	0.1644	0.0106	0.0173
Astrocytes *vs.* Astrocytes co-cultivés	0.9771	0.1451	0.0027	0.9969	0.9224
Astrocytes *vs.* Neurones co-cultivés	0.0001	0.0003	0.0407	0.0297	0.0036
Neurones *vs.* Astrocytes co-cultivés	0.0030	<0.0001	<0.0001	0.0172	0.0264
Neurones *vs.* Neurones co-cultivés	0.9994	0.9916	0.9594	0.8747	0.9869
Astrocytes co-cultivés *vs.* Neurones co-cultivés	0.0015	<0.0001	<0.0001	0.0450	0.0037

Figure III.4 – Quantification de l'expression de PHGDH, PSAT1 et de l'actine dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Régression linéaire à effets multiples	PHGDH	PSAT1	Actine
A *vs.* AD4	0.0001	0.0028	0.0590
A *vs.* AD6	0.0003	0.0039	0.3132
AD4 *vs.* AD6	0.6358	0.7453	0.3321

Figure III.7 – Analyse de la distribution de la fluorescence de PHGDH dans l'hippocampe en fonction de l'âge.

χ^2 sur contingence	WT	3xTg-AD
6 mois *vs.* 12 mois	<0.0001	<0.0001
12 mois *vs.* 18 mois	<0.0001	<0.0001

Figure III.8 – Analyse de la distribution de la fluorescence de la PHGDH dans l'hippocampe.

χ^2 sur contingence	Hippocampe
WT *vs.* 3xTg-AD 6 mois	<0.0001
WT *vs.* 3xTg-AD 12 mois	<0.0001
WT *vs.* 3xTg-AD 18 mois	<0.0001

Figure III.9 – Analyse de la distribution de la fluorescence de la PHGDH dans les sous-régions de l'hippocampe.

χ^2 sur contingence	CA1	CA3	Hilus
WT *vs.* 3xTg-AD 6 mois	<0.0001	<0.0001	<0.0001
WT *vs.* 3xTg-AD 12 mois	<0.0001	0.0066	<0.0001
WT *vs.* 3xTg-AD 18 mois	<0.0001	0.0052	0.0204

Figure III.11 – Analyses morphométriques des astrocytes.

Nested t-test	WT *vs.* 3xTg
Nombre de branches - Soma	0.9998
Nombre total de branches	0.9999
Nombre de terminaisons	0.9985
Convex Hull	0.0056

Figure III.12 – Analyses morphométriques des neurones.

Nested t-test	WT *vs.* 3xTg
Densité boutons synaptiques	0.7600
Densité épines dendritiques totales	0.6419
Densité épines de type mushroom	0.8304
Densité épines de type stubby	0.9731
Densité épines de type thin	0.1028

Figure III.13 – Analyse de la densité synaptique par microscopie électronique.

Multiple t-test	WT *vs.* 3xTg
Densité synaptique totale	0.2571
Densité des synapses asymétriques	0.4875
Densité des synapses symétriques	0.6443

Figure III.14 – Analyse de la couverture astrocytaire des synapses.

Multiple t-test	WT *vs.* 3xTg
Densité synaptique totale	0.9960
Densité des synapses de classe 1	0.9899
Densité des synapses de classe 2	0.3808
Densité des synapses de classe 3	0.3182
χ^2 sur contingence	Distribution des classes
WT *vs.* 3xTg-AD	0.1246

Figure III.16 – La supplémentation chronique en L-sérine restaure le territoire couvert par les astrocytes des souris 3xTg-AD au niveau de celui des souris contrôles.

Nested 1-way ANOVA	Convex Hull
WT *vs.* 3xTg-AD	0.0062
WT *vs.* WT+L	0.5007
WT *vs.* 3xTg-AD+L	0.3353
3xTg-AD *vs.* WT+L	0.1016
3xTg-AD *vs.* 3xTg-AD+L	0.2486
3xTg-AD+L *vs.* WT+L	0.9754

COMMUNICATION 1. CHRONIC L-SERINE SUPPLEMENTATION IMPROVES COGNITIVE BEHAVIOR AND LONG-TERM POTENTIATION IN 3XTG-AD MICE, AN ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL

Poster présenté au(x) :
XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease – Porto, du 10 au 13 juillet 2019
8ème rencontres de la Fondation Alzheimer – Paris, les 19 et 20 novembre 2019

Pierre-Antoine Vigneron[1], Marianne Maugard[1], Marco Matos[2], Stéphane H.R. Oliet[2], Aude Panatier[2] and Gilles Bonvento[1]

[1] Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale, Institut François Jacob, Molecular Imaging Research Center (MIRCen), CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France.

[2] Neurocentre Magendie, INSERM U1215, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

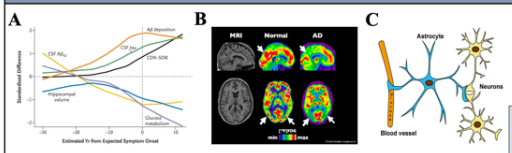
Subtle losses of memory or changes in behavior are the first outward signs of Alzheimer's disease (AD). AD patients often display concomitant reduced glucose metabolism as observed by 18F- fluorodeoxyglucose PET. Whether such energy metabolism deficit contributes to cognitive impairment in AD is still not known. In the brain, oxidative use of glucose provides most of the ATP requires to fuel synaptic activity. However, recent observations suggest that changes in aerobic glycolysis prevail in the early phase of AD. Some glycolytic intermediates can be used as substrates for other metabolic pathways. The phosphorylated pathway diverts 3-phosphoglycerate from the glycolytic flux, to produce *de novo* L-serine through the action of three enzymes (Phgdh, Psat1 and Psph). We and others have found that astrocytes are the main source of L-serine in the brain. Amongst other fates, L-serine can be racemized by serine racemase into D-serine, which is recognized as the major co-agonist of N- methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus, making it a mediator of long-term synaptic plasticity (LTP and LTD). We made the hypothesis that a dysfunction in astrocyte L-serine production, resulting from an altered energy metabolism, could participate in the synaptic and cognitive deficits observed in AD. We used 3xTg-AD mice, a mouse model that recapitulates metabolic and synaptic deficits in addition to classical AD hallmarks such as neurofibrillary tangles and amyloid plaques. We confirmed that young 3xTg-AD mice display an impaired synaptic plasticity, with a reduced HFS- induced LTP when compared to controls. To test our hypothesis, we supplemented our mice (control and 3xTg-AD) with a 10%-L-serine-enriched diet during 2 months and performed electrophysiological recordings. We found that L-serine diet rescued 3xTg-AD LTP to control levels. We then performed the Morris Water Maze (MWM) task which involves hippocampus-relying spatial memory. During the training phase, 3xTg-AD mice learned the task as controls but are unable to distinguish between the four quadrants during the probe test, 72h after the training phase. L-serine supplementation rescued these deficits, and 3xTg-AD mice spent the same time in the target quadrant as control mice. Together, these results suggest a critical role for astrocyte L-serine in long-term synaptic plasticity and spatial memory.

Chronic supplementation of L-serine, an amino-acid produced by astrocytes, improves long-term potentiation and cognitive behavior in 3xTG-AD mice, an Alzheimer's Disease mouse model

T06-009A

P.-A. Vigneron[1], M. Maugard[1], M. Matos[2], M. Gaudin[1], S. H. R. Oliet[2], A. Panatier[2] and G. Bonvento[1]

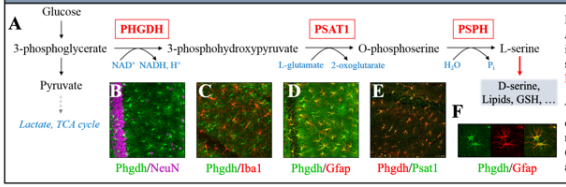
1. Alzheimer's disease is characterized by early hypometabolism & cognitive decline



Autosomal dominant Alzheimer's disease is associated with a series of pathophysiological changes years before the onset of symptoms (**A**, *Bateman et al. New England Journal of Medicine, 2012*). Glucose metabolism (purple line) decreases in some regions, leading to the appearance of hypometabolic clusters (**B**, PET imaging, white arrows).

Does hypometabolism contribute to cognitive deficits?
We hypothesize that astrocytes might play a key role since they are contacting both blood vessels and synapses (**C**).

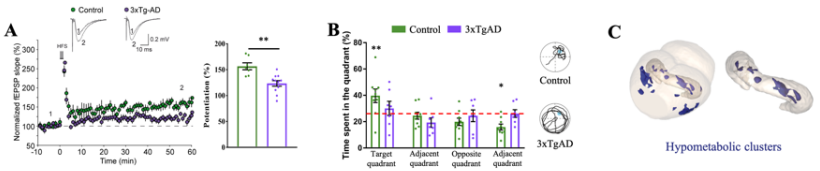
2. L-serine is produced in astrocytes from glycolysis



L-serine is produced by the *Phosphorylated Pathway* (**A**). It starts from 3-phosphoglycerate, an intermediate of glycolysis, and gives rise to L-serine through the action of three enzymes (Phgdh, Psat1 and Psph).

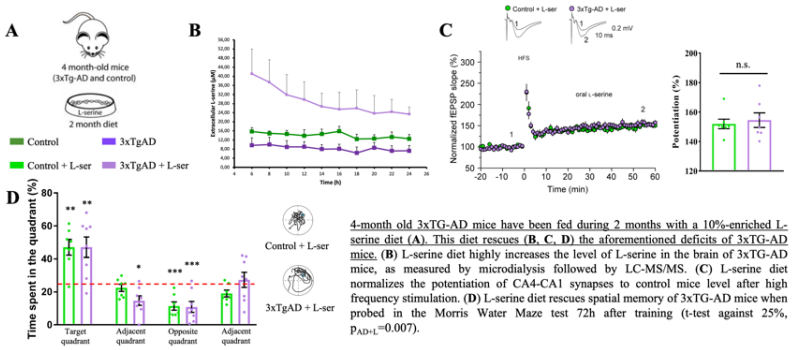
This pathway is mostly occurring in astrocytes as only them express the enzymes (**B** - **F**, Confocal microscopy of CA1 in the hippocampus, 40X and **F** 63X. Phgdh colocalizes only with Gfap, an astrocyte marker, and Psat1).

3. 3xTG-AD mice recapitulate Alzheimer's disease symptoms and exhibit reduced L-serine level in the hippocampus



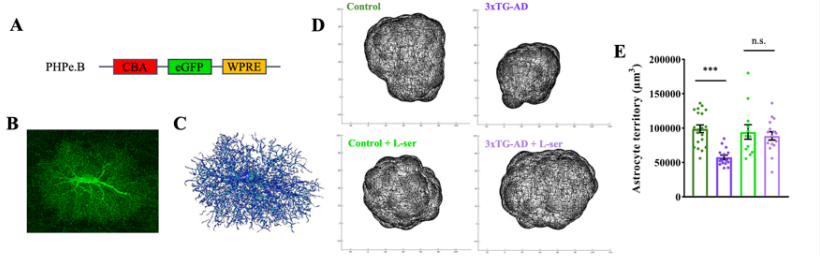
6-month old 3xTG-AD mice display electrophysiological (**A**), cognitive (**B**) and metabolic (**C, E**) deficits. (**A**) 3xTG-AD mice have a reduced potentiation at CA3-CA1 synapses after high-frequency stimulation, Mann-Whitney test, p=0.012. (**B**) 3xTG-AD mice show spatial memory deficits when probed with the Morris Water Maze test 72h after training (t-test against 25%, p_{wt}=0.0037, p_{AD}=0.19). (**C**) 3xTG-AD mice exhibit hypometabolic clusters (decrease in glucose uptake restricted to a region) located in the amygdala, entorhinal cortex and hippocampus when compared to control mice. Clusters were spotted using *in vivo* 3D 2-deoxyglucose autoradiography. (**D**, **E**) 3xTG-AD mice show tendency towards a reduced level of L-serine in the brain (ANOVA on repeated measures, p=0.08). L-serine levels were measured in the extracellular milieu of conscious mice brain using 24-hour microdialysis (collection) and LC-MS/MS (measurement).

4. Chronic L-serine supplementation increases the hippocampus L-serine level and rescues Alzheimer's disease phenotype



4-month old 3xTG-AD mice have been fed during 2 months with a 10%-enriched L-serine diet (**A**). This diet rescues (**B**, **C**, **D**) the aforementioned deficits of 3xTG-AD mice. (**B**) L-serine diet highly increases the level of L-serine in the brain of 3xTG-AD mice, as measured by microdialysis followed by LC-MS/MS. (**C**) L-serine diet normalizes the potentiation of CA4-CA1 synapses to control mice level after high frequency stimulation. (**D**) L-serine diet rescues spatial memory of 3xTG-AD mice when probed in the Morris Water Maze test 72h after training (t-test against 25%, p_{AD+L}=0.007).

5. Chronic L-serine supplementation rescues the morphology of 3xTG-AD astrocytes



3xTG-AD mice display smaller astrocytes that are rescued by L-serine supplementation (**C-F**). 6-month old 3xTG-AD and control mice (+/- L-serine) were injected intra-venously with a low titer of a PHP.eB AAV coding for GFP under control of CBA promoter (**A**). This injection allows for a sparse labelling of both neurons and astrocytes. (**B**) CA1 astrocytes were acquired at high-resolution using confocal microscopy (63X). 3D reconstruction (**C**) was obtained using Vaa3D software. Projection of the territory covered by one astrocyte was obtained with a convex hull analysis (**D**). (**E**) 3xTG-AD astrocytes cover a smaller territory than control astrocytes (Two-way factorial ANOVA, Bonferroni post-hoc, p=0.0002), which is rescued by the 2-month L-serine supplementation.

6. Conclusions & Perspectives

- L-serine supplementation rescues the **electrophysiological**, **metabolic** and **cognitive** deficits of 3xTG-AD mice
- L-serine is necessary for **phospholipid** and **phosphatidylserine** synthesis (membrane constituents) it is thus likely that the L-serine diet impacts **cell morphology** through these pathways

- Assess **synapses' integrity** with electron microscopy
- Define better the **mechanisms driving the beneficial effects** of L-serine supplementation (redox maintenance (GSH), neurotransmission (D-serine), …)
- Assess the effect of the L-serine diet on both the **amyloid and tau pathologies**

7. Acknowledgement & Affiliations

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number ECO20170637547 to PAV) and this presentation is supported by Neuratris with a travel grant.

1. Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale, Institut François Jacob, Molecular Imaging Research Center (MIRCen), CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France.
2. Neurocentre Magendie, INSERM U1215, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Contacts: pierre-antoine.vigneron@cea.fr & gilles.bonvento@cea.fr

COMMUNICATION 2. IMPAIRMENT OF GLYCOLYSIS-DERIVED L-SERINE PRODUCTION IN ASTROCYTES CONTRIBUTES TO COGNITIVE DEFICITS IN ALZHEIMER'S DISEASE

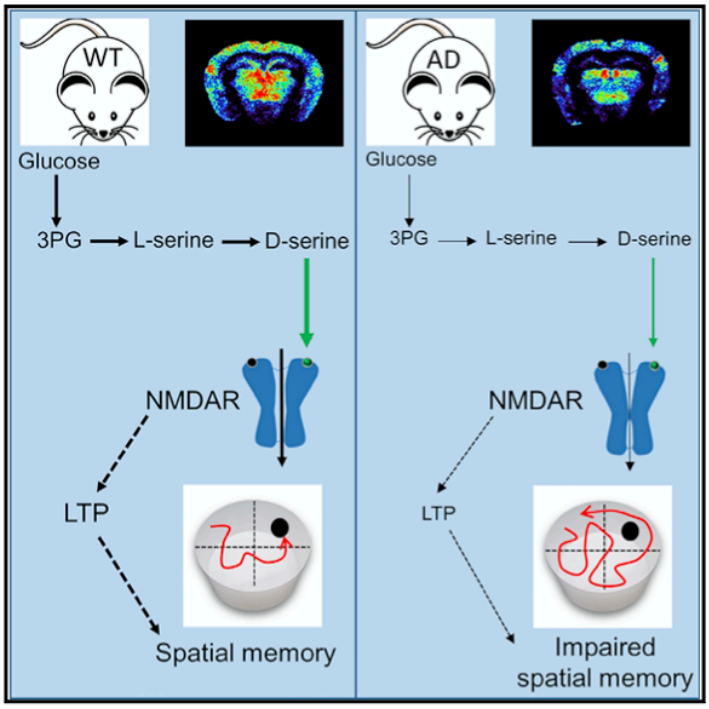
Publié le 3 mars 2020, dans *Cell Metabolism*

Article

Cell Metabolism

Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease

Graphical Abstract



Authors

Juliette Le Douce, Marianne Maugard, Julien Veran, ..., Stéphane H.R. Oliet, Aude Panatier, Gilles Bonvento

Correspondence

aude.panatier@inserm.fr (A.P.), gilles.bonvento@cea.fr (G.B.)

In Brief

Le Douce et al. show that glycolysis is impaired in astrocytes in the early stages of disease in a mouse model of Alzheimer's. This leads to the reduction of both L- and D-serine synthesis and to the alteration of synaptic plasticity and memory. Dietary supplementation with L-serine restores both deficits, suggesting it to be a potential therapy.

Highlights

- Astrocytes have impaired glycolytic flux in a mouse model of Alzheimer's disease
- Consequently, astrocytes produce less glycolysis-derived L-serine
- Low NMDAR occupancy by D-serine leads to impairment of synaptic plasticity and memory
- Dietary supplementation of L-serine restores synaptic plasticity and memory

Le Douce et al., 2020, Cell Metabolism *31*, 503–517
March 3, 2020 © 2020 Elsevier Inc.
https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.004

CellPress

Cell Metabolism
Article

Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease

Juliette Le Douce,[1,13] Marianne Maugard,[1,13] Julien Veran,[2,3,13] Marco Matos,[2,3,13] Pierrick Jégo,[1,14] Pierre-Antoine Vigneron,[1,14] Emilie Faivre,[1,14] Xavier Toussay,[4] Michel Vandenberghe,[1] Yaël Balbastre,[1] Juliette Piquet,[4] Elvire Guiot,[4] Nguyet Thuy Tran,[5] Myriam Taverna,[5,6] Stéphane Marinesco,[7] Ayumi Koyanagi,[8] Shigeki Furuya,[8] Mylène Gaudin-Guérif,[1] Sébastien Goutal,[1] Aurélie Ghettas,[9] Alain Pruvost,[9] Alexis-Pierre Bemelmans,[1] Marie-Claude Gaillard,[1] Karine Cambon,[1] Lev Stimmer,[10] Véronique Sazdovitch,[11] Charles Duyckaerts,[11] Graham Knott,[12] Anne-Sophie Hérard,[1] Thierry Delzescaux,[1] Philippe Hantraye,[1] Emmanuel Brouillet,[1] Bruno Cauli,[4] Stéphane H.R. Oliet,[2,3] Aude Panatier,[2,3,15,*] and Gilles Bonvento[1,15,16,*]

[1]Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRCen, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses, France
[2]Neurocentre Magendie, INSERM U1215, Bordeaux, France
[3]Université de Bordeaux, Bordeaux, France
[4]Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Neurosciences Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS-IBPS), Paris, France
[5]Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, Châtenay-Malabry, France
[6]Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France
[7]AniRA-NeuroChem Technological Platform, Lyon Neuroscience Research Center, CNRS, UMR 5292, INSERM U1028, University Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
[8]Laboratory of Functional Genomics and Metabolism, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan
[9]Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et technologies pour la santé, Gif-sur-Yvette, France
[10]INSERM US27, Platform for Experimental Pathology, MIRCen, Fontenay-aux-Roses, France
[11]Laboratoire de Neuropathologie Raymond Escourolle, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France
[12]BioEM Facility, School of Life Sciences, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland
[13]These authors contributed equally
[14]These authors contributed equally
[15]Senior author
[16]Lead Contact
*Correspondence: aude.panatier@inserm.fr (A.P.), gilles.bonvento@cea.fr (G.B.)
https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.004

SUMMARY

Alteration of brain aerobic glycolysis is often observed early in the course of Alzheimer's disease (AD). Whether and how such metabolic dysregulation contributes to both synaptic plasticity and behavioral deficits in AD is not known. Here, we show that the astrocytic L-serine biosynthesis pathway, which branches from glycolysis, is impaired in young AD mice and in AD patients. L-serine is the precursor of D-serine, a co-agonist of synaptic NMDA receptors (NMDARs) required for synaptic plasticity. Accordingly, AD mice display a lower occupancy of the NMDAR co-agonist site as well as synaptic and behavioral deficits. Similar deficits are observed following inactivation of the L-serine synthetic pathway in hippocampal astrocytes, supporting the key role of astrocytic L-serine. Supplementation with L-serine in the diet prevents both synaptic and behavioral deficits in AD mice. Our findings reveal that astrocytic glycolysis controls cognitive functions and suggest oral L-serine as a ready-to-use therapy for AD.

Context and Significance

A decrease in regional brain glucose consumption is observed in early Alzheimer's disease, decades before neuronal death and clinical symptoms occur. Whether and how this hypometabolism is connected to impaired cognition is not yet known. Researchers in Paris, Bordeaux and their collaborators, have identified a mechanistic link that connects defective glycolysis in astrocytes to impaired L-serine production and reduced neuronal function. Supplementation with L-serine in the diet is able to rescue the cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Understanding this metabolic pathway and its link to brain function may hold promise for the future treatment of other types of neurodegeneration characterized by early hypometabolism like Parkinson's and Huntington's.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disorder characterized by progressive memory decline and cognitive impairment. Functional and physical disruption of synapses is central to the disease process (Forner et al., 2017; Spires-Jones and Hyman, 2014). Dementia due to AD is also characterized by early and progressive metabolic disturbances as observed using [^{18}F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET). FDG-PET changes even precede brain atrophy and neuronal dysfunction (Gordon et al., 2018; Mosconi et al., 2006; Protas et al., 2013). As such, FDG-PET is included among the core biomarkers for clinical and prodromal AD (Garibotto et al., 2017). Although both amyloid-β (Aβ) and tau are central to AD pathogenesis, it remains enigmatic whether and how glucose dysregulation contributes to synaptic defects in AD. Recent observations suggest that changes in aerobic glycolysis prevail in the early phase of AD (An et al., 2018; Vlassenko and Raichle, 2015). 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). L-serine, a non-essential amino acid, is generated through diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) into the phosphorylated pathway. This L-serine biosynthesis pathway is a short metabolic sequence consisting of three enzymatic reactions starting with the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate by 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH). L-serine is a carbon donor for the biosynthesis of many macromolecules and is racemized into D-serine in the brain (Ehmsen et al., 2013). We and others have previously shown that the induction of long-term synaptic potentiation in the adult hippocampus requires the presence of D-serine, the endogenous co-agonist of synaptic NMDA receptors (NMDARs) (Henneberger et al., 2010; Panatier et al., 2006; Papouin et al., 2012; Yang et al., 2003). Therefore, a shortage of glucose may not only directly reduce the availability of ATP required to sustain synaptic transmission, but also decrease the production of both L- and D-serine. In this study, we investigated the contribution of the phosphorylated pathway to early synaptic and behavioral deficits in AD. Our findings highlight oral L-serine as a potential therapy for AD as well as other neurodegenerative diseases.

RESULTS

The serine biosynthesis pathway directly branches from glycolysis (Figure 1A). Alteration of aerobic glycolysis is an early feature of AD. In the brain, a substantial fraction of glucose is thought to be processed via aerobic glycolysis in astrocytes (Bak and Walls, 2018; Barros and Weber, 2018; Magistretti and Allaman, 2015, 2018). We used young 3xTg-AD mice to measure brain glucose metabolism *in vivo*, aerobic glycolysis flux in astrocytes, and serine levels *in vivo*.

Alteration of Glucose Metabolism in 3xTg-AD Mice

We measured energy metabolism in two groups of animals at two stages of progression of the pathology. We used 6- to 7-month-old 3xTg-AD female mice to study the early phase of AD, as only intraneuronal Aβ is present in the brain, and 11- to 12-month-old animals, which display senile plaques (Figures S1A–S1C for the anatomopathological evaluation of our colony of 3xTg-AD mice). *In vivo* 2-deoxyglucose autoradiography (Figure 1B) was followed by 3D voxel-wise statistical analysis to map the differences in cerebral glucose metabolism between control and 3xTg-AD mice (Barros et al., 2018). This approach allows statistically significant unbiased identification of metabolic differences between groups at the voxel level without operator-dependent delineation of regions of interest (Dubois et al., 2010). We found that 6- to 7-month-old 3xTg-AD mice displayed localized decreases in glucose uptake in the amygdala, entorhinal cortex, and hippocampus including CA1, dentate gyrus, and CA2 (Figures 1C and 1E). We also observed increases in glucose uptake in the striatum, auditory cortex, and retrosplenial cortex. Older 3xTg-AD mice (11 to 12 months old) displayed the same hypermetabolic clusters, but the size of the hypometabolic clusters was bigger, particularly in the hippocampus (Figures 1D and 1F). The magnitude of the changes in glucose uptake was similar at both ages. Very little neurodegeneration has been detected in 3xTg-AD mice, at least up to the age of 24 months (Oh et al., 2010; Rohn et al., 2008). Our current observation of an unchanged brain volume between the four groups of mice as measured on Nissl-stained brain sections for all animals used for *in vivo* metabolism (Figures S2A–S2C) corroborates the previous experimental evidence. It is therefore unlikely that cell death could contribute to hypometabolism in the two cohorts of 6- to 7-month-old and 11- to 12-month-old 3xTg-AD female mice. Since most energy is used at the level of excitatory synapses (Harris et al., 2012), we also probed whether the density of excitatory synapses was altered in 3xTg-AD mice. We performed serial block-face scanning electron microscopy at the level of the CA1 region of the hippocampus. We found that the density of excitatory synapses was unchanged in 6-month-old 3xTg-AD mice as compared to control animals (0.976 ± 0.036 versus 0.956 ± 0.012; Figures S2D–S2F). This result strongly suggests that the hypometabolism we observed in 3xTg-AD mice is not due to anatomical or structural changes and that 3xTg-AD mice display localized metabolic changes which start at an early stage of the disease. We next investigated whether the metabolic status of astrocytes was altered in 3xTg-AD mice.

Alteration of Glucose Metabolism in Astrocytes of 3xTg-AD Mice

Resting astrocytes produce lactate in a tonic manner via aerobic glycolysis (Sotelo-Hitschfeld et al., 2015). We monitored astrocyte lactate dynamics in real time in hippocampal slices using Laconic, a fluorescence resonance energy transfer (FRET) lactate nanosensor that was expressed in the hippocampus using an adeno-associated virus (AAV)2/9 (Figure 1G). We first confirmed the specific astrocytic tropism of the AAV2/9 expressing tdTomato under the control of the short gfaABC$_1$D promoter (Figures S3A–S3C). Accordingly, expression of Laconic was restricted to astrocytes (Figure 1H). Lactate transport across the astrocytic plasma membrane is mediated by monocarboxylate transporters (MCTs). We therefore used AR-C155858, an MCT blocker (Ovens et al., 2010), to measure the accumulation of lactate in single astrocytes (Figure 1I) at physiological extracellular glucose concentrations (Silver and Erecińska, 1994). The accumulation of intracellular lactate under MCT blockade observed in astrocytes of control mice was absent in 3xTg-AD astrocytes (Figure 1I). This result indicates that resting lactate

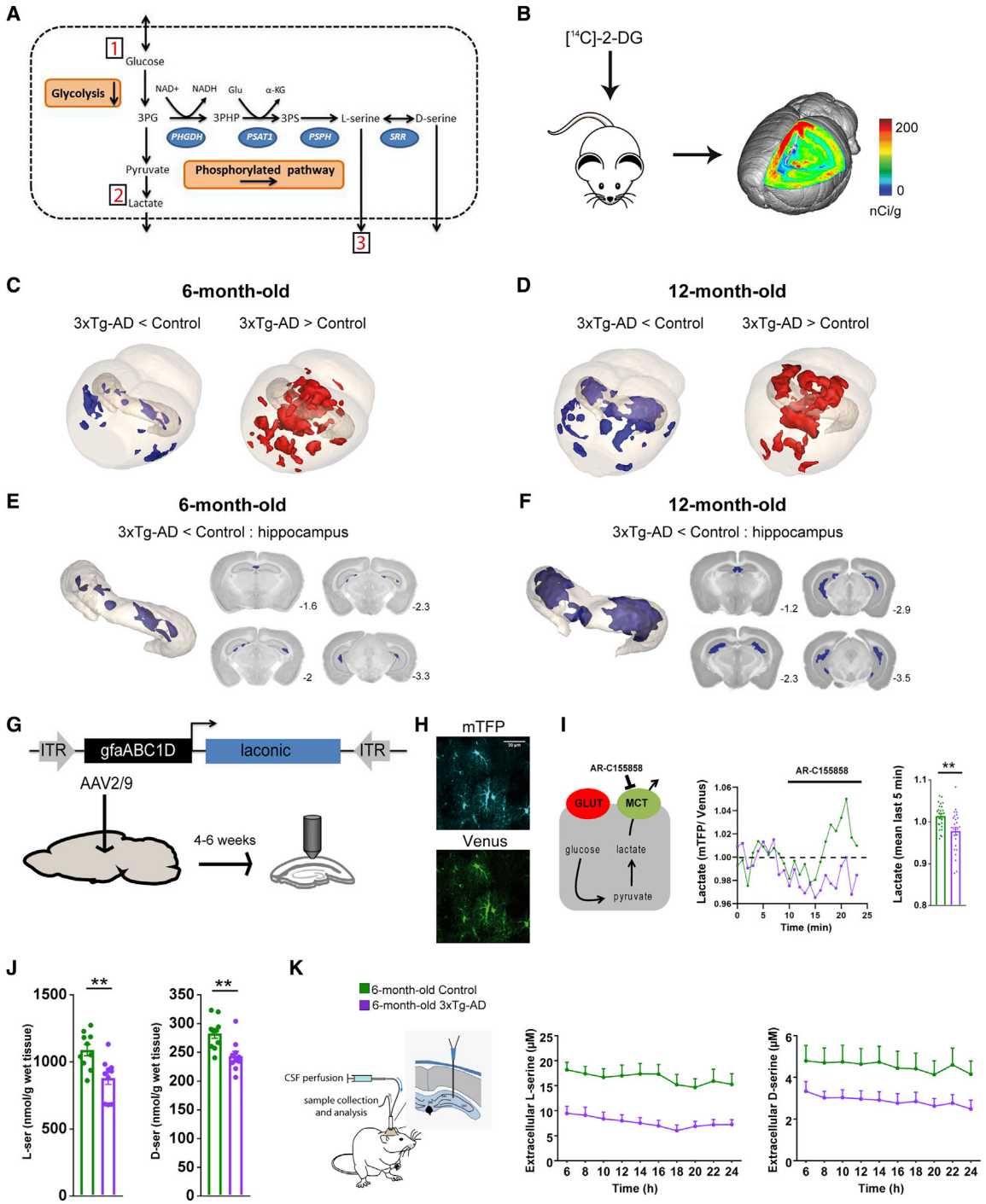


Figure 1. 3xTg-AD Mice Display Energy Metabolism Alterations and Decreased L- and D-Serine Levels

(A) The phosphorylated pathway of L-serine biosynthesis is a short metabolic sequence consisting of three enzymatic reactions. The glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) is converted into phosphohydroxypyruvate (3PHP) in a reaction catalyzed by 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH). 3PHP is metabolized to phosphoserine (3PS) by phosphohydroxypyruvate aminotransferase (PSAT1) and, finally, 3PS is converted into L-serine by phosphoserine phosphatase (PSPH). In the brain, L-serine is converted into D-serine by serine racemase (SRR). 1, 2, and 3 indicate the functional parameters we have measured in 3xTg-AD mice.

(B–D) *In vivo* glucose uptake was measured using 3D-reconstructed autoradiography and voxel-wise statistical analysis (B) to map the cerebral metabolic differences between (C) 6-month-old control (n = 10) and 3xTg-AD mice (n = 10), and (D) between 12-month-old control (n = 9) and 3xTg-AD mice (n = 10). Brains of 3xTg-AD mice display hypometabolic (blue) and hypermetabolic (red) clusters at both ages.

(legend continued on next page)

production via the aerobic glycolytic pathway is altered in 3xTg-AD astrocytes. As L-serine is generated from glucose through diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate into the phosphorylated pathway (Figure 1A), we next investigated whether the defective glycolytic flux in 3xTg-AD astrocytes translated into reduced L-serine production and release.

Lower Levels of L-Serine in 3xTg-AD Mice

We first measured total L-serine level in the hippocampus and found that it was significantly lower in 3xTg-AD (880 ± 48) than in control mice (1089 ± 42 nmol/g wet tissue; Figure 1J). We then measured extracellular L-serine in the hippocampus by *in vivo* microdialysis and found that its concentration was also significantly lower in 3xTg-AD (7.64 ± 1.10) than in control mice (16.61 ± 1.73 μM; Figure 1K). These results strongly suggest that the production and release of L-serine is reduced in young 3xTg-AD mice. We observed these reductions in 6-month-old 3xTg-AD mice that do not exhibit Aβ plaques, overt astrocyte reactivity (GFAP staining), or activated microglia (IBA1 staining) in the CA1 region (Figure S1A and S4A–S4D). L-serine is the obligatory precursor of D-serine, the main co-agonist of synaptic NMDARs in the adult hippocampus. We next monitored the levels of D-serine in the hippocampus of 3xTg-AD mice.

Lower Levels of D-Serine in 3xTg-AD Mice

We measured total D-serine level in the hippocampus and found that it was significantly lower in 6-month-old 3xTg-AD (244 ± 8) than in control mice (283 ± 8 nmol/g wet tissue; Figure 1J). We then measured extracellular D-serine in the hippocampus by *in vivo* microdialysis and found that the concentration of extracellular D-serine was also significantly lower in 6-month-old 3xTg-AD (2.90 ± 0.38) than in control mice (4.53 ± 0.72 μM; Figure 1K). These results strongly suggest that the production and release of D-serine is reduced in young 3xTg-AD mice. We did not find any difference in the level of both total and extracellular glutamate between control and 3xTg-AD mice (Figures S6D and S6E), suggesting no major impairment in glutamate synthesis, release, or uptake in young 3xTg-AD mice. We next performed electrophysiological recordings to assess the functional impact of a lower extracellular D-serine on the activity of NMDARs in 3xTg-AD mice.

Lower Level of Occupancy of the Co-agonist Binding Site of NMDARs in 3xTg-AD Mice

We thus recorded the NMDAR component of field excitatory postsynaptic potentials (NMDAR-fEPSPs) in acute hippocampal slices. In control mice, bath application of D-serine (50 μM) induced an increase of NMDAR-fEPSPs (126.8% ± 7.3%; Figure 2A). This is in accordance with previous work (Henneberger et al., 2010; Papouin et al., 2012), indicating that the co-agonist binding sites of synaptic NMDARs in this region are not fully saturated. Importantly, the D-serine-mediated increase in synaptic NMDAR-fEPSPs was significantly larger in 6- to 7-month-old 3xTg-AD mice (156.6% ± 8.3%; Figure 2A). This is consistent with a reduced level of occupancy of the NMDAR co-agonist binding site in 3xTg-AD mice because of a reduced level of D-serine within the cleft. Another possibility would be that the NMDAR subunit composition was switched from GluN2B to GluN2A in 3xTg-AD mice, since GluN2A-containing NMDARs have a lower affinity for D-serine than GluN2B receptors (Ferreira et al., 2017). In that case, the number of NMDARs recruited during synaptic stimulation could be reduced even if endogenous D-serine levels were unchanged. We tested this possibility by investigating the inhibitory action of a GluN2B antagonist (Ro-25-6981, 2 μM) on NMDAR-EPSPs in both control and 3xTg-AD mice. Experiments were performed in the presence of D-serine (50 μM) to make sure that all synaptic NMDARs were available for activation and to have a better quantification of the NMDAR population present at the synapse. In wild-type (WT) animals, NMDAR-fEPSPs were slightly decreased by Ro-25-6981 (90.8% ± 4.7% of baseline; Figure 2B). Interestingly, a similar effect was observed in 3xTg-AD mice (89.8% ± 4.4% of baseline; Figure 2B). Taken together, these data indicate that the fraction of GluN2B receptors present at CA3-CA1 synapses is very limited and, most importantly, that this fraction is unchanged in 3xTg-AD mice. This result argues against the possibility of a switch of NMDAR subunits in these mice. We next monitored hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity in 3xTg-AD female mice, given the role played by D-serine in NMDAR activity.

Impaired Synaptic Plasticity in 3xTg-AD Mice

As originally reported (Oddo et al., 2003), high-frequency stimulation (HFS)-induced long-term potentiation (LTP) was impaired in 6- to 7-month-old 3xTg-AD (156.7% ± 6.7% in control versus 123.5% ± 5.4% in 3xTg-AD; Figure 2C). We found that low-frequency stimulation (LFS)-induced long-term depression (LTD) was also reduced in these animals (79.9% ± 9.5% in control versus 114.5% ± 6.6% in 3xTg-AD; Figure 2E).

Impaired Synaptic Plasticity in 3xTg-AD Mice Is Rescued by D-Serine

All these results support the hypothesis that the deficits in synaptic plasticity observed in 3xTg-AD mice are due to a lower concentration of D-serine in the synaptic cleft and thus to fewer NMDARs available for activation during HFS and LFS. In agreement with this hypothesis, LTP was rescued by supplying exogenous D-serine

(E and F) Only hypometabolic clusters were observed in the hippocampus in 6-month-old 3xTg-AD (E), and their sizes were larger in 12-month-old 3xTg-AD mice (F) (Student's t test, $p < 0.01$). Numbers indicate the anatomical position relative to Bregma.
(G) Design of the AAV2/9 expressing the FRET sensor Laconic that was injected in the CA1 region of the hippocampus in 6-month-old control (n = 3) and 3xTg-AD (n = 3) mice.
(H) CA1 astrocytes expressing the FRET lactate sensor Laconic in an acute hippocampal slice showing mTFP (blue) and Venus (green).
(I) Typical response of intracellular lactate to bath application of 1μM AR-C155858, a monocarboxylate transporter blocker. Astrocytes of 6-month-old 3xTg-AD mice (n = 3, seven slices, 26 cells) do not accumulate lactate as compared to control astrocytes (n = 3 mice, six slices, 33 cells; Mann-Whitney U Test, $^{**}p < 0.01$).
(J) Total levels of L-serine and D-serine measured by HPLC are significantly lower in 6-month-old 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, $^{**}p = 0.005$).
(K) Extracellular levels of L-serine and D-serine measured by microdialysis and LC-MS/MS are significantly lower in 6-month-old 3xTg-AD mice as compared to control animals (Repeated-measures ANOVA; $F(1, 10) = 15.691$, $p = 0.0027$ for L-serine; and $F(1, 11) = 5.4482$, $p = 0.0396$ for D-serine).
Data are presented as mean with SEM.

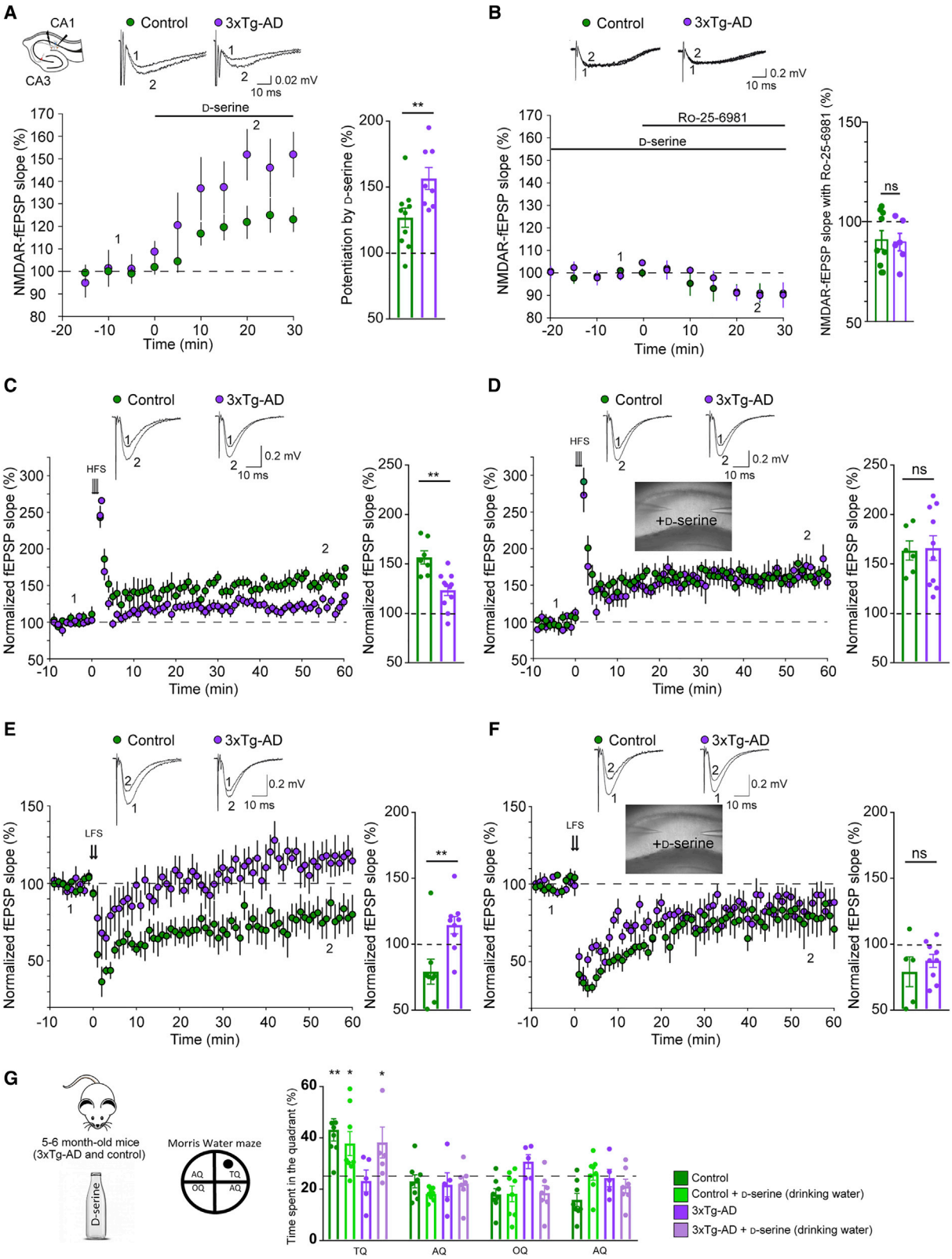


Figure 2. Deficits of Synaptic Plasticity at CA3-CA1 Synapses and of Spatial Memory in 3xTg-AD Mice Are Rescued by D-Serine

(A) Electrophysiological recordings were performed on acute brain slices of 6- to 7-month-old 3xTg-AD and control mice with the stimulating electrode located in CA1 and the recording electrode located in CA1 close to the subiculum. Effect of D-serine application (50 μM) on NMDAR-fEPSPs in slices obtained from control

(legend continued on next page)

(50 μM) to slices obtained from 3xTg-AD mice (163.6% ± 9.7% in control versus 166.1% ± 12.4% in 3xTg-AD; Figure 2D). Similarly, exogenous D-serine (50 μM) completely rescued LTD in 3xTg-AD mice (79.1% ± 11.3% in control versus 87.5% ± 4.9% in 3xTg-AD; Figure 2F). Acute application of D-serine did not affect LTP and LTD in slices obtained from control mice (Figures 2C–2F). We next assessed whether D-serine could rescue the spatial memory deficits of 3xTg-AD mice.

Impaired Spatial Memory in 3xTg-AD Mice Is Rescued by D-Serine

We evaluated learning and memory using the spatial reference version of the Morris water maze that is hippocampal-dependent (Morris, 1984). 3xTg-AD mice displayed a similar spatial learning performance than age-matched control mice but did not show any preference for the target quadrant during the probe trial (Figure 2G). We chronically treated mice with D-serine in the drinking water (~100mg/kg body weight), a regimen that has been previously shown to increase levels of D-serine in the brain (Otte et al., 2013). Oral supplementation of D-serine for two weeks rescued the cognitive deficits of 6- to 7-month-old female 3xTg-AD mice but did not modify the performance of control mice (Figure 2G). These results all point to defective D-serine availability at the hippocampal synapses of 3xTg-AD mice. We then asked whether the reduced production of L-serine could be responsible for the D-serine-mediated impairment of synaptic plasticity and spatial behavior. If this is the case, inactivation of the L-serine biosynthetic pathway should recapitulate the signs observed in 3xTg-AD mice. While *Phgdh*, the first enzyme of the L-serine synthetic pathway, was recently reported to be expressed mostly in astrocytes and oligodendrocytes, but not in neurons (see http://www.brainrnaseq.org/ and http://mousebrain.org/genesearch.html), the cellular localization of PHGDH has not been thoroughly studied in the brain. We therefore performed a histological study focusing on the hippocampus.

The Serine Synthetic Pathway Is Primarily Located in Astrocytes

The first committed step of the L-serine biosynthetic pathway is the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate (3PHP) by PHGDH (Figure 1A). A specific antibody directed against PHGDH showed prominent staining of astrocytes not only in mouse but also in non-human primate and human brain (Figure 3A). We performed co-localization studies with confocal microscopy in a control mouse brain and confirmed that PHGDH was mainly expressed by GFAP-expressing astrocytes and not microglial cells (IBA1-positive), neurons (NeuN-positive), or oligodendrocytes (Olig2-positive) in the CA1 region of the hippocampus (Figure 3B). We next developed a conditional mouse model to interrogate the role of the astrocytic hippocampal PHGDH in synaptic plasticity and spatial behavior.

Conditional Inactivation of *Phgdh* Leads to Impaired Synaptic Plasticity and Spatial Memory

Mice conditionally lacking *Phgdh* in astrocytes have been previously generated by crossing $Phgdh^{flox/flox}$ mice with hGFAP-Cre transgenic mice (Yang et al., 2010). Since hGFAP-cre transgene mediates gene deletions in a much wider spectrum of neural cells than just astrocytes (Zhuo et al., 2001), we locally and conditionally inactivated *Phgdh* by injecting an AAV expressing Cre recombinase under the control of the astrocytic $gfaABC_1D$ promoter in the hippocampus of adult $Phgdh^{flox/flox}$ mice (Figure 3C). At the transcriptional level, *Phgdh* mRNA was ~25% of its initial value found in both non-injected and AAV-GFP-injected mice (Figure 3D). At the protein level, PHGDH expression was significantly reduced in $Phgdh^{flox/flox}$ mice injected with AAV-Cre in comparison to mice injected with AAV-GFP (Figures 3E–3H). Astrocytes lose some of their normal functions when they become reactive (Liddelow et al., 2017). The levels of expression of mRNA for *vimentin* and *gfap* and of GFAP were not significantly different between $Phgdh^{flox/flox}$ mice injected with AAV-Cre or AAV-GFP (Figures S5A–S5D). We next performed a Sholl analysis on GFAP immunostained astrocytes and showed that the complexity of astrocyte processes was not altered following inactivation of *Phgdh* (Figures S5E and S5F). These results strongly suggest that astrocytes did not adopt a reactive phenotype following inactivation of *Phgdh*. The levels of expression of selected neuronal and microglial mRNAs (Neun, eaat3, cd68, and iba1) and of D-amino acid oxidase (daao), the enzyme that degrades D-serine, were not significantly different between $Phgdh^{flox/flox}$ mice injected with

(green) and 3xTg-AD mice (purple). Traces of representative NMDAR-fEPSPs recorded before (1) and during (2) D-serine application. Bar graph summarizing results presented in (A) indicates that NMDAR co-agonist binding site occupancy was decreased in 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, p = 0.008; control: n = 10; 3xTg-AD: n = 8).

(B) The application of Ro-25-6981 (2μM) only slightly reduces NMDAR-fEPSPs in slices obtained from control and 3xTg-AD mice. D-serine (50 μM) was bath-applied to make sure that all synaptic NMDARs were available for activation. Bar graph summarizing results presented in (B) indicates that GluN2B receptors contribute to a small fraction of the synaptic NMDARs in both control and 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, p = 0.75; control: n = 9; 3xTg-AD: n = 6).

(C) Traces represent typical fEPSPs evoked before (1) and after (2) high-frequency stimulation (HFS). LTP was significantly impaired in 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, p = 0.012). Bar graph summarizing experiments presented in (C) (control: n = 7; 3xTg-AD: n = 11).

(D) D-serine application (50 μM) rescued LTP in 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, p = 0.958). Bar graph summarizing experiments presented in (D) (control: n = 6; 3xTg-AD: n = 10).

(E) Representative traces of characteristic fEPSPs evoked before (1) and after (2) low-frequency stimulation (LFS). LTD was significantly impaired in 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, p = 0.008). Bar graph summarizing experiments presented in (E) (control: n = 8; 3xTg-AD: n = 9).

(F) D-serine application (50 μM) rescued LTD in 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, p = 0.699). Bar graph summarizing experiments presented in (F) (control: n = 5; 3xTg-AD: n = 9).

(G) 3xTg-AD mice present spatial memory deficits (one tailed one sample t test against chance level [25%], p = 0.19) when probed in the Morris Water maze 72 h after training as compared to control mice (p = 0.0037). Chronic oral D-serine supplementation (drinking water for 2 weeks) restored the spatial memory deficits of 3xTg-AD mice (p = 0.035) and was without any effect in control mice (p = 0.014). AQ, adjacent quadrant; OQ, opposite quadrant; TQ, target quadrant. n = number of mice, one slice per animal.

Data are presented as mean with SEM.

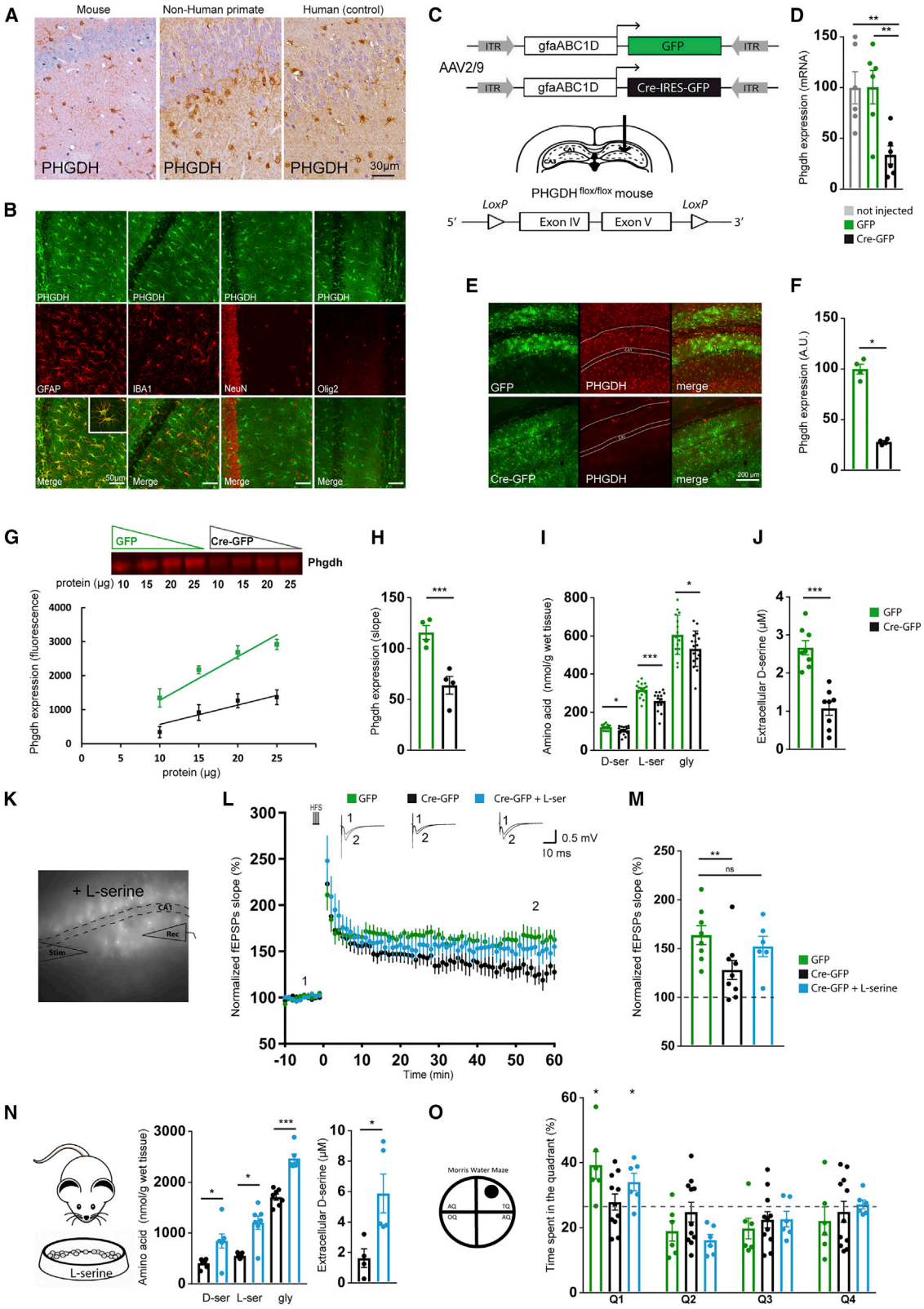


Figure 3. Conditional Inactivation of *Phgdh* in Astrocytes Impairs Synaptic Plasticity and Spatial Memory

(A) Immunostaining of PHGDH in the hippocampus of a mouse, a non-human primate, and a human brain. PHGDH is mainly expressed in astrocytes.

(B) Double immunofluorescent staining of brain sections from 6-month-old control mice using PHGDH (green) and either an astrocyte marker (GFAP, red), a microglial marker (IBA1, red), a neuronal marker (NeuN, red), or an oligodendrocyte marker (Olig2, red).

(legend continued on next page)

AAV-Cre or AAV-GFP (Figures S5G–S5K), indicating no marked neuronal death, no microglial activation, and no compensatory mechanisms targeting D-serine levels following local inactivation of *Phgdh*.

We then confirmed that the levels of L- and D-serine in the brain are determined by their *de novo* biosynthesis through the phosphorylated pathway in astrocytes. Indeed, the total L-serine, D-serine, and glycine content in the whole hippocampus, measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Figure 3I), as well as the level of extracellular D-serine, measured *in vivo* via a biosensor (Figure 3J), were significantly lower in *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice injected with AAV-Cre in comparison to mice injected with AAV-GFP. We subsequently investigated whether long-term synaptic plasticity was impaired in those mice (Figure 3K). HFS-induced LTP was significantly impaired in these animals (166.8% ± 5.8% in AAV-GFP-injected, and 133.9% ± 13.5% in AAV-Cre-injected mice; Figures 3L and 3M). Bath application of L-serine (50 μM) rescued LTP (152.2% ± 12.0%; Figures 3L and 3M), indicating that L-serine produced by the phosphorylated pathway is required for activity-dependent synaptic plasticity. We performed several behavioral tests on these mice to assess their anxiety and monitor their motor and cognitive performance. The mice with inactivated *Phgdh* in the hippocampus did not show any alterations in anxiety or spontaneous motor behavior, as assessed using the elevated plus-maze and the PhenoTyper (Figures S5L and S5M). Those mice were tested using the Morris water maze and displayed a similar spatial learning performance to control mice. However, they did show significant impairment of spatial memory when they were tested 72 h after learning the location of the platform (Figure 3O), as we observed with 3xTg-AD mice. Finally, to determine whether L-serine is necessary and sufficient to promote spatial memory in the hippocampus, we fed *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice injected with AAV-Cre with a diet enriched in L-serine for 1 month. We found that the diet was sufficient to restore total levels of L-serine, D-serine, and glycine in the whole hippocampus as well as the extracellular levels of D-serine (Figure 3N). Accordingly, the spatial memory was restored in those animals (Figure 3O). Overall, these results show that the availability of L-serine synthesized via the phosphorylated pathway in astrocytes is a key determinant for normal NMDAR function and support our hypothesis that its dysregulation could contribute to memory deficits in AD. To gain further insight into the potential contribution of the astrocytic L-serine synthesis pathway in AD, we investigated whether the expression of PHGDH was altered both in young 3xTg-AD mice and in post-mortem brain tissue of AD patients.

Expression of PHGDH Is Reduced in the AD Brain

We analyzed the expression of PHGDH in 6-month-old female 3xTg-AD mice that do not display Aβ plaques (Figure 4A) and found no difference as compared to control age-matched animals using immunofluorescent confocal analysis (Figure 4B) or immunoblotting (Figure 4C). This result suggests that the lower L-serine levels in 3xTg-AD mice is more likely resulting from reduced glucose uptake and less substrate available for the L-serine synthesis pathway rather than from a direct effect of Aβ on PHGDH expression, at least during the early phase of AD (i.e., astrocytes are not reactive and Aβ plaques are not formed). We then performed immunohistochemistry on human formalin-fixed paraffin-embedded sections (Figure 4D) from control individuals, intermediate AD (Braak III–IV), and advanced AD (Braak VI) patients (Table 1). Contrarily to 6-month-old female 3xTg-AD mice, advanced AD patients presented numerous Aβ plaques, hyperphosphorylated Tau, and reactive GFAP-positive astrocytes (Figure 4E). We observed a reduction of PHGDH staining (Figure 4E), which was confirmed by fluorescent immunoblotting (Figure 4F) of frozen sections from the same patients. The reduction was statistically significant in intermediate AD (−62%) and even more pronounced in advanced AD patients (−82%). These results indicate that a progressive alteration of the astrocytic serine synthetic pathway occurs in the brain of AD patients. Altogether, these data support the contribution of defective production and release of L-serine in astrocytes to the pathogenesis of AD and point to L-serine supplementation as a potential therapy. We finally asked whether supplying exogenous L-serine could also rescue both synaptic plasticity and spatial behavior deficits in 3xTg-AD mice.

(C) Design of the AAV2/9 expressing Cre-IRES-GFP that was injected in the CA1 region of the hippocampus in *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice.
(D) Level of *phgdh* mRNA was ~25% of its initial value as compared to both non-injected and GFP-injected mice (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test, $p = 0.004$ versus not-injected and $p = 0.005$ versus GFP).
(E) Three weeks after injection of the AAV-Cre, expression of PHGDH (red) was markedly decreased compared to the AAV-GFP.
(F) Quantification of the PHGDH fluorescence (Nested model $p = 0.011$, $n = 2$ mice, 10–12 confocal images per mouse).
(G and H) Fluorescent immunoblotting of PHGDH performed using four different protein concentrations showed a linear relationship (G) and a significant reduction of PHGDH expression (H) (linear regression model, $p < 0.001$).
(I and J) Total levels of D-serine, L-serine, and glycine measured by HPLC were significantly reduced in the hippocampus (I) (Mann-Whitney U test, $p = 0.012$; $p < 0.001$, $p = 0.027$, respectively), as well as extracellular levels of D-serine measured using biosensors (J) (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$).
(K) Electrophysiological recordings were performed in CA1 region expressing fluorescent astrocytes.
(L) LTP was significantly impaired in *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice injected with the AAV-Cre. Traces represent typical fEPSPs evoked before (1) and after (2) LTP induction. LTP was rescued by bath application of 50μM L-serine.
(M) Bar graphs summarizing results presented in (L) (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test, $p = 0.031$).
(N) Chronic supplementation with L-serine restored both the total levels of D-serine, L-serine, and glycine (Mann-Whitney U test, $p = 0.026$; $p = 0.017$, $p < 0.001$, respectively), as well as the extracellular levels of D-serine (Mann-Whitney U test, $p = 0.016$).
(O) *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice injected with the AAV-Cre displayed a significant impairment of spatial memory during the probe test of the Morris water maze 72 h after learning the location of the platform (one tailed one sample t test against chance level [25%], $p = 0.14$), while *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice injected with the AAV-GFP significantly spent more time in the TQ ($p = 0.02$). Chronic supplementation with L-serine restored spatial memory in *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice injected with the AAV-Cre ($p = 0.02$). AQ, adjacent quadrant; OQ, opposite quadrant; TQ, target quadrant.
Data are presented as mean with SEM.

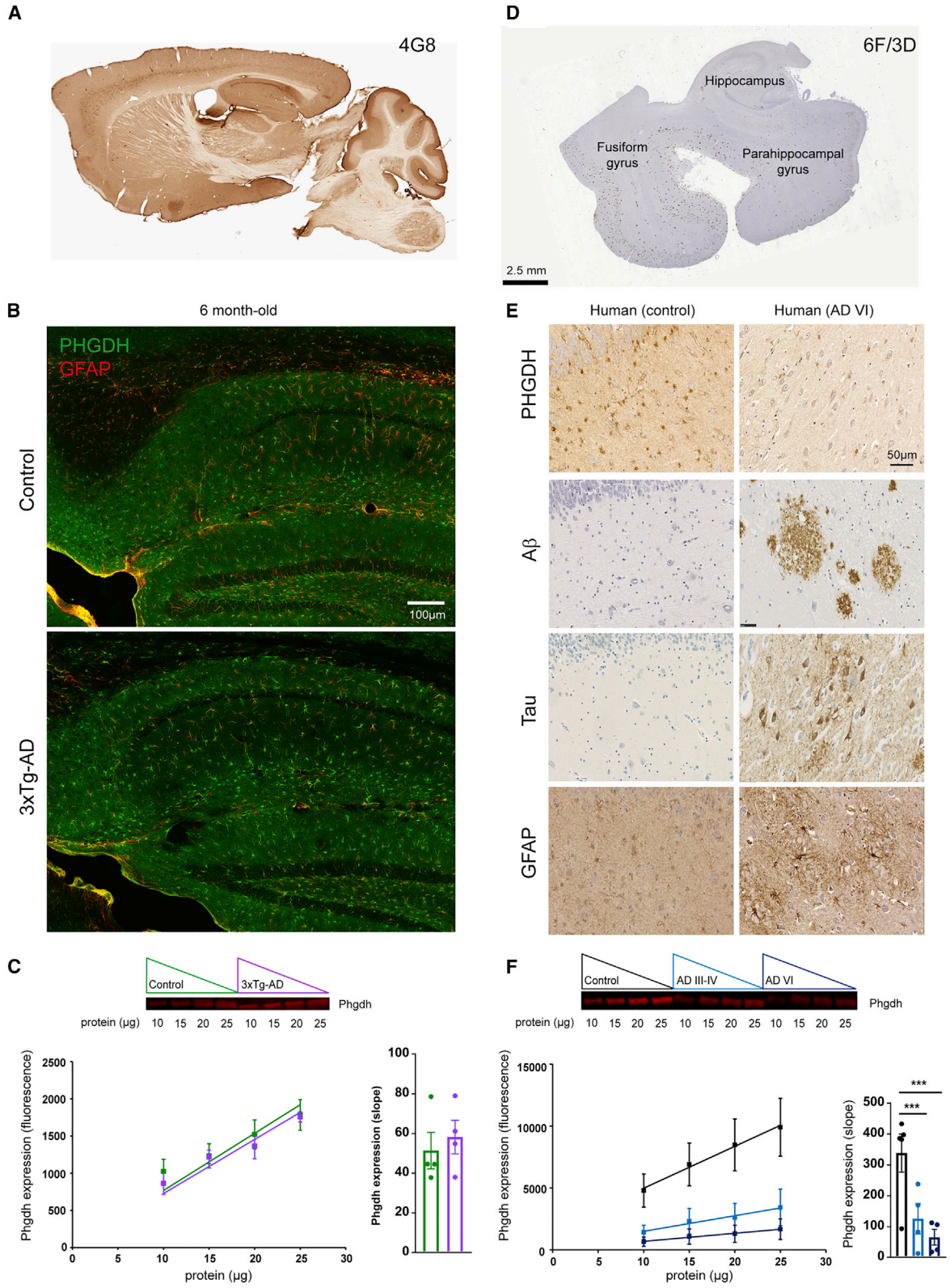


Figure 4. Expression of PHGDH in 3xTg-AD Mice and in AD Human Samples

(A–C) Six-month-old female 3xTg-AD mice (A) that do not present Aβ plaques (4G8 immunostaining) (B) did not display significant reduction of PHGDH expression as observed using immunofluorescent staining or immunoblotting in the hippocampus (C). Four different concentrations of proteins were loaded per sample, and the expression of PHGDH was derived from the slopes of the regression lines (linear regression model, p = 0.79).

(legend continued on next page)

Table 1. Demographic Data on Studied Cases

Diagnosis	Cases	Sex	Age (Years)	PMD (h)
Control	1#	M	78	23
	2#	F	92	21
	3#	F	60	28
	4#	M	69	6
	5#	M	81	62
	6	F	53	29
AD (III–IV)	7#	M	70	31
	8#	F	76	28
	9#	M	81	34.5
	10#	F	73	21.5
	11	F	90	35
	12	F	92	33
	13	F	66	N/A
AD (VI)	14#	M	72	44
	15#	F	89	59
	16#	M	73	54
	17#	M	69	30
	18#	F	94	25
	19	M	68	34.5
	20	F	61	27
	21	M	87	27

AD (III–IV): Alzheimer's disease, Braak III–IV.
AD (VI): Alzheimer's disease, Braak VI.
PMD: postmortem delay; N/A: Not Available; # used for immunoblotting.

Oral L-Serine as a Potential Therapy for AD

We first assessed the effects of acute L-serine (50 μM) on LTP. Bath application of L-serine (50 μM) fully rescued LTP in slices obtained from 3xTg-AD mice (156.8% ± 7.4% in control versus 160.5% ± 6.4% in 3xTg-AD; Figure 5A). Since long-term treatment with exogenous L-serine can compensate for its deficient production in the context of inherited metabolic disorders of L-serine biosynthesis (see Discussion), we next assessed the effects of chronic oral L-serine supplementation upon both the long-term synaptic plasticity and the spatial memory performance of 3xTg-AD and control mice. Four-month-old mice were given a 10% L-serine-enriched diet for 2 months (Figure 5B). Total L-serine content in the whole hippocampus was significantly higher in the two groups of animals that received the diet (Figure 5B) as compared to untreated animals (Figure 1J). Two months after chronic L-serine diet, total L-serine content was no longer significantly different between control and 3xTg-AD mice (1590 ± 87 versus 1844 ± 73 nmol/g wet tissue, respectively; Figure 5B). The diet also boosted *de novo* production of D-serine since its content in the whole hippocampus was significantly higher in the two groups of animals that received the diet (see Figure 1J for comparison with untreated animals) up to a level that was not different between control and 3xTg-AD mice (496 ± 11 versus 512 ± 28 nmol/g wet tissue for control and 3xTg-AD mice, respectively; Figure 5B). Using *in vivo* microdialysis, we found that the levels of extracellular L- and D-serine were higher in 3xTg-AD mice receiving the diet than in untreated 3xTg-AD mice (24.91 ± 6.29 versus 7.64 ± 1.10 μM and 8.22 ± 1.79 versus 2.90 ± 0.38 μM for L- and D-serine, respectively; see Figure 1K for comparison with untreated animals). The diet did not significantly alter the total levels of other amino acids measured in the hippocampus; only a modest increase in phenylalanine level was observed (Figures S6A–S6I). We then observed that in 3xTg-AD mice fed with L-serine, bath application of D-serine (50 μM) induced a similar increase of NMDAR-fEPSPs to the one measured in control animals (126.3% ± 3.5% in control versus 124.4% ± 2.3% in 3xTg-AD; Figure 5C). This result indicates that the chronic supplementation of L-serine was able to rescue the deficit of D-serine availability observed at hippocampal synapses in 3xTg-AD mice, thereby restoring the level of occupancy of the NMDAR co-agonist binding site to its control values. Accordingly, LTP was fully rescued in those animals (152.0% ± 3.2% in control versus 154.5% ± 5.0% in 3xTg-AD; Figure 5D). We finally probed the spatial memory performance in 3xTg-AD mice fed with L-serine and found that it reached a level similar to the one measured in control mice fed with L-serine (Figure 5E). Altogether, these data support the use of oral L-serine as a ready-to-use and safe therapy for of AD.

DISCUSSION

Glial cells have been recently implicated in AD. Astrocytes and microglia are now recognized as potential cellular mediators of synapse dysfunction and loss (Hong et al., 2016; Jo et al., 2014). Here, we have identified an astrocytic metabolic pathway that directly contributes to early synaptic deficits underlying cognitive decline in AD, well before microglia and astrocytes become reactive (Liddelow et al., 2017). We showed that the production of L-serine, a non-essential amino acid that is generated from glucose, is impaired in AD astrocytes.

The L-serine biosynthetic pathway has been well studied in cancer cells that exhibit increased glucose metabolism to lactate (the so-called Warburg effect) and in which multiple copies of *Phgdh* divert glycolytic flux and provide L-serine and glycine for rapid cell growth and proliferation (Locasale et al., 2011; Possemato et al., 2011). L-serine is a central node for the biosynthesis of many molecules such as sphingolipids and phospholipids. It also supplies carbon to the one-carbon pool, which is

(D) Human post-mortem brain samples included the hippocampus, parahippocampal gyrus, and fusiform gyrus and presented numerous Aβ plaques (6F/3D immunostaining).
(E) Expression of PHGDH was reduced in an advanced AD brain (Braak VI) that presented amyloid plaques (Aβ staining using 6F/3D antibody), hyperphosphorylated Tau (AT8), and GFAP reactive astrocytes as observed on formalin-fixed paraffin-embedded sections.
(F) Fluorescent immunoblots of fresh brain tissues from controls (n = 5), AD Braak III–IV (n = 4), and AD Braak VI (n = 5). Four different concentrations of proteins were loaded per sample, and the expression of PHGDH was derived from the slopes of the regression lines. Expression of PHGDH was significantly lower in intermediate AD cases (−62%) and in advanced AD patients (−82%) as compared to controls (linear regression model, $p < 0.001$).
Data are presented as mean with SEM.

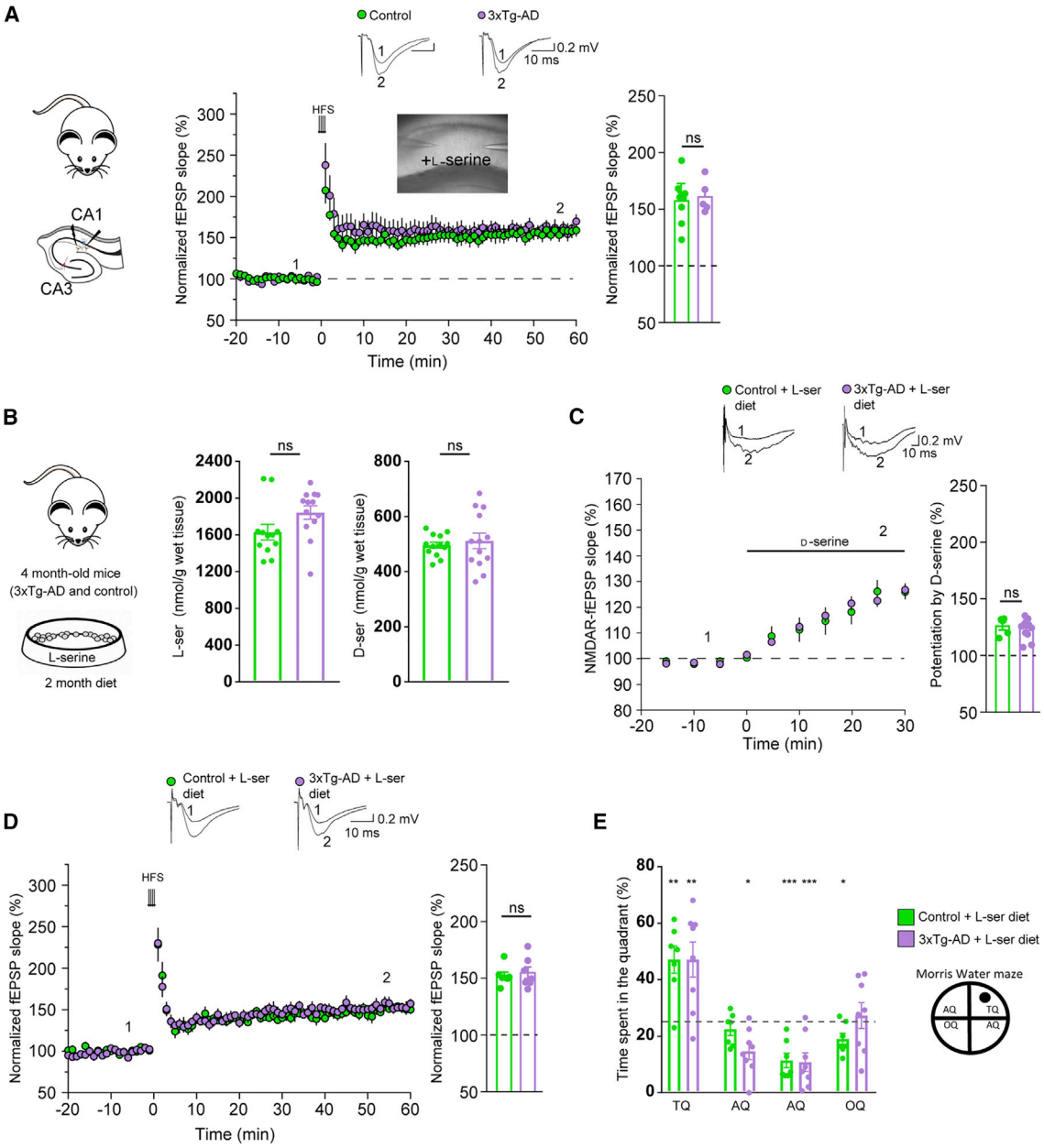


Figure 5. Deficits of Synaptic Plasticity at CA3-CA1 Synapses and of Spatial Memory in 3xTg-AD Mice Are Rescued by L-Serine

(A) Bath L-serine (50 μM) application in hippocampal acute slices rescued LTP in 3xTg-AD mice to the same level as control mice (Mann-Whitney U test, p = 0.97; control: n = 8; 3xTg-AD: n = 5). Traces represent typical fEPSPs evoked before (1) and after (2) LTP induction. Bar graph summarizing experiments presented in (A).

(B) 3xTg-AD and control 4-month-old mice received chronic oral L-serine supplementation (food enriched with 10% L-serine for 2 months). The total concentration of L- and D-serine in the hippocampus was similar in both groups of mice after L-serine treatment.

(C) Chronic L-serine diet restored NMDAR co-agonist binding site occupancy measured in 3xTg-AD mice to the same value measured in control mice (Mann-Whitney U test, p = 0.63; control: n = 5; 3xTg-AD: n = 13). Traces of representative NMDAR-fEPSPs recorded before (1) and during (2) D-serine application (50 μM). Bar graph summarizing results presented in (C).

(D) Chronic oral L-serine supplementation fully restored the LTP deficits of 3xTg-AD mice (Mann-Whitney U test, p = 0.8; control: n = 7; 3xTg-AD: n = 7). Representative traces of characteristic fEPSPs evoked before (1) and after (2) LTP induction. Bar graph summarizing results presented in (D).

(E) 3xTg-AD mice fed with a food enriched in 10% L-serine for 2 months spent more time in the target quadrant (one tailed one sample t test against chance level [25%], p = 0.007), similarly to control mice fed with the same diet (p = 0.0011), during the probe test of the Morris water maze. AQ, adjacent quadrant; OQ, opposite quadrant; TQ, target quadrant. Data are presented as mean with SEM.

involved in folate metabolism, contributing to purine synthesis (Mattaini et al., 2016). This metabolic pathway is particularly essential for the nervous system as homozygous mutations of each of the three enzymes of the serine biosynthesis pathway cause a syndrome called Neu-Laxova, a rare autosomal-recessive disorder characterized by severe peripheral and central nervous system malformations (microcephaly), leading to prenatal or early postnatal death (Acuna-Hidalgo et al., 2014). This clinical phenotype of L-serine biosynthesis is reminiscent of defects in brain serine transport induced by mutations in *SLC1A4*, the gene coding for the neutral amino acid transporter ASCT1 (Damseh et al., 2015), underlying the critical role of L-serine biosynthesis and shuttling. L-serine treatment during pregnancy and after birth improves fetal brain growth and prevents neurological symptoms (de Koning et al., 2004), suggesting that exogenous L-serine can compensate for its lack of *de novo* production in the brain.

In the present work, we focused our attention on glycolysis as a possible regulator of L-serine production in the brain as L-serine is generated from glucose. In AD, early alterations of cerebral glucose metabolism, as measured using fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) and positron emission tomography (PET), are well established. 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]). We used 3D analysis of *in vivo* brain glucose metabolism to show that 3xTg-AD mice display metabolic impairment in specific brain regions, including the hippocampal formation. Vascular dysregulation (Iturria-Medina et al., 2016), as well as endothelial glucose transporter 1 (GLUT1) reductions, are mechanisms by which Aβ could likely exert its deleterious metabolic effects (Winkler et al., 2015). Glucose, the almost exclusive energy substrate of the brain, is glycolytically processed to produce pyruvate and lactate in astrocytes, whereas neurons predominantly process glucose through the pentose phosphate pathway to produce NADPH and utilize pyruvate and lactate from astrocytes to feed the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the associated oxidative phosphorylation to produce ATP (Herrero-Mendez et al., 2009). Our observation that PHGDH, whose substrate is a glycolytic intermediate, is exclusively expressed by astrocytes is consistent with the notion that astrocytes are glycolytic cells. Even if we do not provide a causal link between the defective hippocampal glycolysis and the alteration of the phosphorylated pathway, our findings suggest that astrocytic energy metabolism may control L-serine production, thereby influencing glutamatergic neurotransmission. In addition to lactate (Suzuki et al., 2011; Yang et al., 2014), we propose that another byproduct of aerobic glycolysis (L-serine) may play an important role in plasticity and learning.

In the brain, L-serine is the obligatory precursor of D-serine (Ehmsen et al., 2013), a physiological ligand of the co-agonist site of synaptic NMDARs in the hippocampus, which is required to sustain synaptic transmission (Panatier et al., 2006; Papouin et al., 2012). Our electrophysiological recordings show a reduced level of occupancy of the NMDAR glycine-binding site in 6- to 7-month-old 3xTg-AD mice. Accordingly, D-serine completely rescued both forms of synaptic plasticity (LTP and LTD) as well as spatial memory. Chronic D-serine supplementation has long been considered a therapeutic option for pathological conditions involving NMDAR malfunction such as schizophrenia (Kantrowitz et al., 2016), but its slow and weak diffusion through the blood-brain barrier and potential nephrotoxicity have limited its clinical use. L-serine represents a more favorable therapeutic option because it is considered to be safe by the Food and Drug Administration; it has been approved as a normal food additive, it is widely sold as a dietary supplement, and is well-tolerated, even at high doses. L-serine is currently prescribed for the treatment of Neu-Laxova syndrome, which results in L-serine deficiency (van der Crabben et al., 2013) and is currently in a Phase I clinical trial as a treatment for hereditary sensory autonomic neuropathy type 1 (Garofalo et al., 2011) and amyotrophic lateral sclerosis (Levine et al., 2017). L-serine supplementation was recently shown to ameliorate motor and cognitive performance in rare NMDA-related severe encephalopathy leading to glutamatergic signaling deficiency (Soto et al., 2019). Glutamate excitotoxicity has long been implicated in AD pathophysiology, as supported by the use of the uncompetitive NMDAR partial antagonist memantine to treat moderate-severe AD patients. Although it is possible that increasing D-serine concentrations in AD patients may exacerbate glutamate excitotoxicity, this would probably not occur at an early stage of the pathology, when memantine is not yet effective (Schneider et al., 2011). It is noteworthy that people living in Okinawa, a Japanese island known for the overall longevity of its population, have a diet characterized by an L-serine content that is four times higher than that of the average American (Cox and Metcalf, 2017).

This study finally points to direct impairment of the phosphorylated pathway in AD, as shown by a marked reduction of PHGDH expression in AD patients. This is the first demonstration of the selective expression of PHGDH in human hippocampal astrocytes, as well as its decrease during the progression of AD. Since we did not observe any change in PHGDH expression in 6-month-old 3xTg-AD mice that do not display Aβ plaques and whose astrocytes are not reactive, it is therefore highly conceivable that the primary event leading to less serine production would be related to altered glycolysis flux in early AD and that PHGDH expression would be affected in later AD stages. The fact that brain glucose metabolism is altered in the early phase of AD patients is compatible with such a hypothesis. Unfortunately, there is no consensus on the evolution of L- and D-serine levels in AD (Biemans et al., 2016; Lin et al., 2017; Madeira et al., 2015). Additional studies are necessary to determine whether, where, and when the levels of L- and D-serine change during disease progression. Altogether, these data raise the prospect of L-serine supplementation as a treatment option for AD and possibly other neurodegenerative diseases.

Limitations of Study

There are some limitations to our study, which should be acknowledged. First, we only performed this study in a single model of AD (3xTg-AD mice). It would be important to investigate whether the reduced production of L-serine by astrocytes that we uncovered is a general feature that can be found in another transgenic AD mouse models that do not present the Tau mutations. Second, we analyzed a rather limited number of

human hippocampal samples and it may be worthwhile to complete the analysis with more samples coming from other brain regions as well. Finally, an intriguing question that will be important to investigate in the future is the impact of the supplementation of L-serine in the diet on the amyloid load and the Tau hyperphosphorylation.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Mouse Models
  - Human Samples
- METHOD DETAILS
  - *In Vivo* [^{14}C]-2-Deoxyglucose Uptake
  - Postmortem Image Registration, Three-Dimensional Reconstruction and Analysis
  - Generation of AAVs and Stereotaxic Injection in Mice
  - FRET Imaging of Brain Slices
  - Electron Microscopy
  - Immunohistochemistry of Human Brain Samples
  - Immunofluorescence Staining of Mouse Brain
  - Immunohistochemistry of Mouse Brain
  - Sholl Analysis
  - Immunoblotting of Human Brain Samples
  - Immunoblotting of Mouse Brain Samples
  - RNA Extraction and qRT-PCR
  - Microdialysis
  - Determination of L- and D-serine
  - Electrophysiology
  - Behavioral Analyses
  - Supplementation of L- or D-serine
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSES
- DATA AND CODE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.004.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Martine Guillermier and Sueva Bernier for useful technical help; and Felipe Barros, Juan Bolanos, and Igor Allaman for helpful discussion. We thank Noëlle Dufour and Charlène Joséphine for viral production, the Neuro-CEB biobank at the Hôpital de la Pitié-Salpétrière for providing human samples, Anaelle Dubois for electron microscopy at the BioEM Facility of the EPFL (Switzerland), and Alain Chédotal and Stéphane Fouquet at the Institut de la Vision for high resolution scans. We also thank Delphine Gonzales, Sara Laumond, and everyone at the animal and genotyping facilities of the NeuroCentre Magendie for mouse care and genotyping.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (G.B., S.H.R.O., and A. Panatier), Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011 MALZ-0003 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.), Fondation Plan Alzheimer (G.B.), Infrastructure de Recherche translationnelle pour les Biothérapies en Neurosciences (NeurATRIS ANR-11-INBS-0011 to G.B.), and Fondation pour la Recherche Médicale and EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research (JPND; Horizon 2020 Framework Programme, grant agreement 643417/DACAPO-AD to S.H.R.O.). J.L.D. is a recipient of a PhD fellowship from the CEA (IRTELIS program). M. Maugard is a recipient of a PhD fellowship from the Ecole Normale Supérieure (ENS). P.-A.V. is a recipient of a PhD fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). P.J.'s fellowship was provided by Enhanced Eurotalents, a Marie Sklodowska-Curie Actions Programme, co-funded by the European Commission and managed by the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA). M. Matos is a recipient of a post-doctoral fellowship (DACAPO-AD/JPND/EU H20H20 grant agreement N°643417). This work benefited from the support of various facilities granted by INSERM and LabEX BRAIN ANR-10-LABX-43. The team of G.B. is part of the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP) training network and that of S.H.R.O is part of the LabEx BRAIN.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L.D. performed the confocal analysis, carried out the biochemical, qRT-PCR and the metabolic studies and developed the AAVs with the help of M. Maugard, A.-P.B. and M.-C.G.; J.V. and M. Matos performed electrophysiology on 3xTg-AD mice with the help of A. Panatier; M. Maugard performed all experiments on *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice, immunoblotting, and all behavioral tests with the help of K.C.; P.J. carried out electrophysiology on *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice; P.-A.V., P.J., and M.G.-G. performed microdialysis; N.T.T., M.T., S.G., A.G., and A. Pruvost measured extracellular amino acid concentrations using CE-LIF or LC-MS/MS; E.F. performed the histological analysis of the 3xTg-AD colony and performed the *in vivo* metabolic study with the help of G.B. and M.G.-G.; X.T. carried out the FRET imaging experiments with the help of J.P., E.G., and B.C.; M.V., Y.B., A.-S.H., and T.D. performed the 3D image processing and analysis of the *in vivo* metabolic data; S.M. and M. Maugard measured extracellular D-serine using biosensors; A.K. and S.F. provided the *Phgdh*$^{flox/flox}$ mice and measured amino acid concentrations using HPLC; L.S., V.S., and C.D. performed and analyzed immunohistochemical staining on human samples with the help of P.-A.V.; G.K. performed EM studies; P.H. and E.B. provided materials and discussed the data; B.C., S.H.R.O., and G.B. obtained funding for the research; and A. Panatier and G.B. coordinated the study and wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: July 25, 2019
Revised: October 25, 2019
Accepted: February 7, 2020
Published: March 3, 2020

REFERENCES

Acuna-Hidalgo, R., Schanze, D., Kariminejad, A., Nordgren, A., Kariminejad, M.H., Conner, P., Grigelioniene, G., Nilsson, D., Nordenskjöld, M., Wedell, A., et al. (2014). Neu-Laxova syndrome is a heterogeneous metabolic disorder caused by defects in enzymes of the L-serine biosynthesis pathway. Am. J. Hum. Genet. *95*, 285–293.

An, Y., Varma, V.R., Varma, S., Casanova, R., Dammer, E., Pletnikova, O., Chia, C.W., Egan, J.M., Ferrucci, L., Troncoso, J., et al. (2018). Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. *14*, 318–329.

Bak, L.K., and Walls, A.B. (2018). CrossTalk opposing view: lack of evidence supporting an astrocyte-to-neuron lactate shuttle coupling neuronal activity to glucose utilisation in the brain. J. Physiol. *596*, 351–353.

Barros, L.F., and Weber, B. (2018). CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain. J. Physiol. *596*, 347–350.

Barros, L.F., Bolaños, J.P., Bonvento, G., Bouzier-Sore, A.K., Brown, A., Hirrlinger, J., Kasparov, S., Kirchhoff, F., Murphy, A.N., Pellerin, L., et al. (2018). Current technical approaches to brain energy metabolism. Glia *66*, 1138–1159.

Berger, A., Lorain, S., Josephine, C., Desrosiers, M., Peccate, C., Voit, T., Garcia, L., Sahel, J.A., and Bemelmans, A.P. (2015). Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Mol. Ther. *23*, 918–930.

Biemans, E.A., Verhoeven-Duif, N.M., Gerrits, J., Claassen, J.A., Kuiperij, H.B., and Verbeek, M.M. (2016). CSF d-serine concentrations are similar in Alzheimer's disease, other dementias, and elderly controls. Neurobiol. Aging *42*, 213–216.

Cohen, A.D., and Klunk, W.E. (2014). Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. Neurobiol. Dis. *72* (Pt A), 117–122.

Cox, P.A., and Metcalf, J.S. (2017). Traditional Food Items in Ogimi, Okinawa: l-Serine Content and the Potential for Neuroprotection. Curr. Nutr. Rep. *6*, 24–31.

Damseh, N., Simonin, A., Jalas, C., Picoraro, J.A., Shaag, A., Cho, M.T., Yaacov, B., Neidich, J., Al-Ashhab, M., Juusola, J., et al. (2015). Mutations in SLC1A4, encoding the brain serine transporter, are associated with developmental delay, microcephaly and hypomyelination. J. Med. Genet. *52*, 541–547.

de Koning, T.J., Klomp, L.W., van Oppen, A.C., Beemer, F.A., Dorland, L., van den Berg, I., and Berger, R. (2004). Prenatal and early postnatal treatment in 3-phosphoglycerate-dehydrogenase deficiency. Lancet *364*, 2221–2222.

Dubois, A., Hérard, A.S., Flandin, G., Duchesnay, E., Besret, L., Frouin, V., Hantraye, P., Bonvento, G., and 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., Hérard, A.S., Delatour, B., Hantraye, P., Bonvento, G., Dhenain, M., and 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, J.T., Ma, T.M., Sason, H., Rosenberg, D., Ogo, T., Furuya, S., Snyder, S.H., and Wolosker, H. (2013). D-serine in glia and neurons derives from 3-phosphoglycerate dehydrogenase. J. Neurosci. *33*, 12464–12469.

Esaki, K., Kokido, T., Ohmori, T., Tsukino, M., Ohshima, T., and Furuya, S. (2011). Soy peptide ingestion increases neuroactive amino acids in the adult brain of wild-type and genetically engineered serine-deficient mice. Journal of Nutrition & Food Sciences *1*, 109.

Ferreira, J.S., Papouin, T., Ladépêche, L., Yao, A., Langlais, V.C., Bouchet, D., Dulong, J., Mothet, J.P., Sacchi, S., Pollegioni, L., et al. (2017). Co-agonists differentially tune GluN2B-NMDA receptor trafficking at hippocampal synapses. Elife *6*, https://doi.org/10.7554/eLife.25492.

Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A.C., Trujillo-Estrada, L., and LaFerla, F.M. (2017). Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. Trends Neurosci. *40*, 347–357.

Garibotto, V., Herholz, K., Boccardi, M., Picco, A., Varrone, A., Nordberg, A., Nobili, F., and Ratib, O.; Geneva Task Force for the Roadmap of Alzheimer's Biomarkers (2017). Clinical validity of brain fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a biomarker for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. Neurobiol. Aging *52*, 183–195.

Garofalo, K., Penno, A., Schmidt, B.P., Lee, H.J., Frosch, M.P., von Eckardstein, A., Brown, R.H., Hornemann, T., and Eichler, F.S. (2011). Oral L-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1. J. Clin. Invest. *121*, 4735–4745.

Gordon, B.A., Blazey, T.M., Su, Y., Hari-Raj, A., Dincer, A., Flores, S., Christensen, J., McDade, E., Wang, G., Xiong, C., et al. (2018). Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. Lancet Neurol. *17*, 241–250.

Harris, J.J., Jolivet, R., and Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. Neuron *75*, 762–777.

Hay, Y.A., Lambolez, B., and Tricoire, L. (2016). Nicotinic Transmission onto Layer 6 Cortical Neurons Relies on Synaptic Activation of Non-α7 Receptors. Cereb. Cortex *26*, 2549–2562.

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. Nature *463*, 232–236.

Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. Nat. Cell Biol. *11*, 747–752.

Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. Science *352*, 712–716.

Iturria-Medina, Y., Sotero, R.C., Toussaint, P.J., Mateos-Pérez, J.M., and Evans, A.C.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. Nat. Commun. *7*, 11934.

Janes, K.A. (2015). An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. Sci. Signal. *8*, rs2.

Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y.J., Chun, Y.E., Park, M., Woo, D.H., Bae, J.Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., et al. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. Nat. Med. *20*, 886–896.

Kantrowitz, J.T., Epstein, M.L., Beggel, O., Rohrig, S., Lehrfeld, J.M., Revheim, N., Lehrfeld, N.P., Reep, J., Parker, E., Silipo, G., et al. (2016). Neurophysiological mechanisms of cortical plasticity impairments in schizophrenia and modulation by the NMDA receptor agonist D-serine. Brain *139*, 3281–3295.

Lebenberg, J., Hérard, A.S., Dubois, A., Dauguet, J., Frouin, V., Dhenain, M., Hantraye, P., and Delzescaux, T. (2010). Validation of MRI-based 3D digital atlas registration with histological and autoradiographic volumes: an anatomo-functional transgenic mouse brain imaging study. Neuroimage *51*, 1037–1046.

Levine, T.D., Miller, R.G., Bradley, W.G., Moore, D.H., Saperstein, D.S., Flynn, L.E., Katz, J.S., Forshew, D.A., Metcalf, J.S., Banack, S.A., and Cox, P.A. (2017). Phase I clinical trial of safety of L-serine for ALS patients. Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener. *18*, 107–111.

Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature *541*, 481–487.

Lin, C.H., Yang, H.T., Chiu, C.C., and Lane, H.Y. (2017). Blood levels of D-amino acid oxidase vs. D-amino acids in reflecting cognitive aging. Sci. Rep. *7*, https://doi.org/10.1038/s41598-017-13951-7.

Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., et al. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. Nat. Genet. *43*, 869–874.

Lorenzo, M.P., Villaseñor, A., Ramamoorthy, A., and 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, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *27*, 441–464.

Madeira, C., Lourenco, M.V., Vargas-Lopes, C., Suemoto, C.K., Brandão, C.O., Reis, T., Leite, R.E., Laks, J., Jacob-Filho, W., Pasqualucci, C.A., et al. (2015). d-serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development. Transl. Psychiatry *5*, e561.

Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2015). A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. Neuron *86*, 883–901.

Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. Nat. Rev. Neurosci. *19*, 235–249.

Mattaini, K.R., Sullivan, M.R., and Vander Heiden, M.G. (2016). The importance of serine metabolism in cancer. J. Cell Biol. *214*, 249–257.

McDonough, A.A., Veiras, L.C., Minas, J.N., and Ralph, D.L. (2015). Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *308*, C426–C433.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods *11*, 47–60.

Mosconi, L., Sorbi, S., de Leon, M.J., Li, Y., Nacmias, B., Myoung, P.S., Tsui, W., Ginestroni, A., Bessi, V., Fayyazz, M., et al. (2006). Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. J. Nucl. Med. *47*, 1778–1786.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron *39*, 409–421.

Oh, K.J., Perez, S.E., Lagalwar, S., Vana, L., Binder, L., and Mufson, E.J. (2010). Staging of Alzheimer's pathology in triple transgenic mice: a light and electron microscopic analysis. Int. J. Alzheimers Dis. *2010*, https://doi.org/10.4061/2010/780102.

Otte, D.M., Barcena de Arellano, M.L., Bilkei-Gorzo, A., Albayram, O., Imbeault, S., Jeung, H., Alferink, J., and Zimmer, A. (2013). Effects of Chronic D-Serine Elevation on Animal Models of Depression and Anxiety-Related Behavior. PLoS One *8*, e67131.

Ovens, M.J., Davies, A.J., Wilson, M.C., Murray, C.M., and Halestrap, A.P. (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.

Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. Cell *125*, 775–784.

Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.P., and Oliet, S.H. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. Cell *150*, 633–646.

Pernot, P., Mothet, J.P., Schuvailo, O., Soldatkin, A., Pollegioni, L., Pilone, M., Adeline, M.T., Cespuglio, R., and Marinesco, S. (2008). Characterization of a yeast D-amino acid oxidase microbiosensor for D-serine detection in the central nervous system. Anal. Chem. *80*, 1589–1597.

Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. Nature *476*, 346–350.

Protas, H.D., Chen, K., Langbaum, J.B., Fleisher, A.S., Alexander, G.E., Lee, W., Bandy, D., de Leon, M.J., Mosconi, L., Buckley, S., et al. (2013). Posterior cingulate glucose metabolism, hippocampal glucose metabolism, and hippocampal volume in cognitively normal, late-middle-aged persons at 3 levels of genetic risk for Alzheimer disease. JAMA Neurol. *70*, 320–325.

Rohn, T.T., Vyas, V., Hernandez-Estrada, T., Nichol, K.E., Christie, L.A., and Head, E. (2008). Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. J. Neurosci. *28*, 3051–3059.

Rueckert, D., Sonoda, L.I., Hayes, C., Hill, D.L.G., Leach, M.O., and Hawkes, D.J. (1999). Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images. IEEE Trans. Med. Imaging *18*, 712–721.

San Martín, A., Ceballo, S., Ruminot, I., Lerchundi, R., Frommer, W.B., and Barros, L.F. (2013). A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. PLoS One *8*, e57712.

Schneider, L.S., Dagerman, K.S., Higgins, J.P.T., and McShane, R. (2011). Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. Arch. Neurol. *68*, 991–998.

Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. J. Anat. *87*, 387–406.

Silver, I.A., and Erecińska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. J. Neurosci. *14*, 5068–5076.

Sotelo-Hitschfeld, T., Niemeyer, M.I., Mächler, P., Ruminot, I., Lerchundi, R., Wyss, M.T., Stobart, J., Fernández-Moncada, I., Valdebenito, R., Garrido-Gerter, P., et al. (2015). Channel-mediated lactate release by K^+-stimulated astrocytes. J. Neurosci. *35*, 4168–4178.

Soto, D., Olivella, M., Grau, C., Armstrong, J., Alcon, C., Gasull, X., Santos-Gómez, A., Locubiche, S., Gómez de Salazar, M., García-Díaz, R., et al. (2019). l-Serine dietary supplementation is associated with clinical improvement of loss-of-function *GRIN2B*-related pediatric encephalopathy. Sci. Signal. *12*, https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw0936.

Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. Neuron *82*, 756–771.

Sugimoto, H., Kakehi, M., and Jinno, F. (2015). Bioanalytical method for the simultaneous determination of D- and L-serine in human plasma by LC/MS/MS. Anal. Biochem. *487*, 38–44.

Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. Cell *144*, 810–823.

van der Crabben, S.N., Verhoeven-Duif, N.M., Brilstra, E.H., Van Maldergem, L., Coskun, T., Rubio-Gozalbo, E., Berger, R., and de Koning, T.J. (2013). An update on serine deficiency disorders. J. Inherit. Metab. Dis. *36*, 613–619.

Vandenberghe, M.E., Hérard, A.S., Souedet, N., Sadouni, E., Santin, M.D., Briet, D., Carré, D., Schulz, J., Hantraye, P., Chabrier, P.E., et al. (2016). High-throughput 3D whole-brain quantitative histopathology in rodents. Sci. Rep. *6*, 20958.

Vasylieva, N., Barnych, B., Meiller, A., Maucler, C., Pollegioni, L., Lin, J.S., Barbier, D., and Marinesco, S. (2011). Covalent enzyme immobilization by poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE) for microelectrode biosensor preparation. Biosens. Bioelectron. *26*, 3993–4000.

Vlassenko, A.G., and Raichle, M.E. (2015). Brain aerobic glycolysis functions and Alzheimer's disease. Clin. Transl. Imaging *3*, 27–37.

Winkler, E.A., Nishida, Y., Sagare, A.P., Rege, S.V., Bell, R.D., Perlmutter, D., Sengillo, J.D., Hillman, S., Kong, P., Nelson, A.R., et al. (2015). GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. Nat. Neurosci. *18*, 521–530.

Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 15194–15199.

Yang, J.H., Wada, A., Yoshida, K., Miyoshi, Y., Sayano, T., Esaki, K., Kinoshita, M.O., Tomonaga, S., Azuma, N., Watanabe, M., et al. (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. J. Biol. Chem. *285*, 41380–41390.

Yang, J., Ruchti, E., Petit, J.M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *111*, 12228–12233.

Zhuo, L., Theis, M., Alvarez-Maya, I., Brenner, M., Willecke, K., and Messing, A. (2001). hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. Genesis *31*, 85–94.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Phgdh (3-phosphoglycerate dehydrogenase), polyclonal rabbit antibody	Frontier Institute	Cat# 3PGDH-Rb, RRID:AB_2571653
Phgdh (3-phosphoglycerate dehydrogenase), polyclonal guinea pig antibody	Frontier Institute	Cat# 3PGDH-GP, RRID:AB_2571654
Tau, mouse Phospho-Tau (Ser202, Thr205) monoclonal antibody (AT8)	Thermo Fisher	Cat# MN1020; RRID: AB_223647
Tau, mouse Phospho-Tau (Thr231) monoclonal antibody (AT180)	Thermo Fisher	Cat# MN1040; RRID: AB_223649
Amyloid fibrils, polyclonal rabbit antibody OC	Millipore	Cat# AB2286; RRID: AB_1977024
Tau, mouse monoclonal antibody HT7	Innogenetics	Cat# BR01
Abeta, clone 6F3D, monoclonal mouse anti-human beta-amyloid	Dako	Cat# M0872
Abeta, clone 4G8, monoclonal mouse antibody	Covance	Cat# SIG-39220; RRID: AB_2564634
Gfap, polyclonal rabbit antibody, Dako, lot 096	Dako	Cat# Z0334; RRID: AB_10013382
Gfap-Cy3, monoclonal mouse Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (mouse IgG1 isotype) conjugated to Cy3, clone GA5	Sigma	Cat# C9205
NeuN, monoclonal mouse antibody, clone A60	Millipore	Cat#MAB377; RRID: AB_2298772
Iba1, ploYclonal rabbit antibody	Wako	Cat# 019-19741; RRID: AB_839504
Olig2-Alexa488, rabbit ploYclonal antibody to Oligodendrocyte transcription gactor 2 (olig2) coupled to Alexafluor 488	Millipore	Cat# AB9610-af488
Bacterial and Virus Strains		
AAV2/9-gfaABC$_1$D-Laconic	Our facility	N/A
AAV2/9-gfaABC$_1$D-tdTomato	Our facility	N/A
AAV2/9-gfaABC$_1$D-GFP	Our facility	N/A
AAV2/9-gfaABC$_1$D-Cre-IRES-GFP	Our facility	N/A
Biological Samples		
Human hippocampal brain blocks	GIE NeuroCeb biobank	https://www.neuroceb.org/fr/
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Deoxy-D-glucose, 2-[14C(U)]	Perkin Elmer	CAT# NET328001MC
AR-C155858	Tocris	Cat. No. 4960
EZ Prep for paraffin removal	Roche Diagnostics	Cat# 950-102
Ribo CC, Citrate based buffer optimized for heat pretreatments	Roche Diagnostics	Cat# 760-107
Discovery Ab PBS-based diluent	Roche Diagnostics	Cat# 760-108
DISCOVERY DAB Map Detection Kit	Roche Diagnostics	Cat# 760-124
Critical Commercial Assays		
QuantiChrom™ Glucose Assay Kit	Universal Biologicals	CAT# DIGL-100
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: B6;129-Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa Psen1tm1Mpm/Mmjax	The Jackson Laboratory	MMRRC Stock No:34830-JAX
Mouse: B6129SF1/J	The Jackson Laboratory	Stock No:101043
Mouse: floxed phgdh	Yang et al., 2010	N/A

(*Continued on next page*)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Oligonucleotides		
Primers for mouse phgdh, gfap, vimentin, rbfox3, slc1a1, cd68, iba1, ppia and daao		N/A
5′-AAGTTCATGGGGACAGAGCTGAAC-3′ (forward) and 5′-CCTTCACCATGTCCACAAACTGGA-3′ (reverse)	phgdh	N/A
5′-ACGACTATCGCCGCCAACT-3′ (forward) and 5′-GCCGCTCTAGGGACTCGTTC-3′ (reverse)	gfap	N/A
5′-TCGAGGTGGAGCGGGACAAC-3′ (forward) and 5′-TGCAGGGTGCTTTCGGCTTC-3′ (reverse)	vimentin	N/A
5′-CAACTCCACCCTTCCGACCC-3′ (forward) and 5′-TCCCGAATTGCCCGAACAT-3′ (reverse)	rbfox3 (NeuN)	N/A
5′-ATGTGCTACATGCCGATTGG-3′ (forward) and 5′-CTCAGGACAGTGGCCATGTAAA-3′ (reverse)	Slc1a1	N/A
5′-GCCAGCCCTACGACCAG-3′ (forward) and 5′-TGGTGGTGGCAGGGTTATGA-3′ (reverse)	cd68	N/A
5′-CCAGCCTAAGACAACCAGCGTC-3′ (forward) and 5′-GCTGTATTTGGGATCATCGAGGAA-3′ (reverse)	iba1	N/A
5′-ATGGCAAATGCTGGACCAAA-3′ (forward) and 5′-GCCTTCTTTCACCTTCCCAAA-3′ (reverse)	ppia (cyclophilin)	N/A
5′- GGTGGCAAGAGGAGTGGAT-3′ (forward) and 5′-GATGATGTACGGAGAGTTGTAGATA-3′ (reverse)	daao	N/A
Software and Algorithms		
pClamp 9 for electrophysiology	Molecular Devices	https://www.moleculardevices.com/products/axon-patch-clamp-system/acquisition-and-analysis-software/pclamp-software-suite
Image Studio 5.2 for fluorescent immunoblots	Li-Cor	https://www.licor.com/bio/image-studio-lite/
Labchart for voltametry	AD Instruments	https://www.adinstruments.com/products/labchart
Ethovision for behavioral studies	Noldus	https://www.noldus.com/
32 KaratTM system 7.0 for capillary electrophoresis	Sciex	https://sciex.com.cn/Documents/manuals/pa-800-plus-sw-validation-summary.pdf
Fiji for confocal images	Fiji	https://fiji.sc/
R for statistical analyses	R	https://www.r-project.org/
Prism for statistical analyses	GraphPad	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
BrainVisa for 3D autoradiography	Brainvisa	http://brainvisa.info
ImageJ for FRET data	ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/
Statistica for statistical analyses	StatSoft	http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be made available upon reasonable request by the Lead Contact, Gilles Bonvento (gilles.bonvento@cea.fr). This study did not generate new unique reagents.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mouse Models

All experimental procedures using animals were performed in strict accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130). They conform to the ethical guidelines of both the European Directive (2010/63/EU) 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 (Approvals 12-084, 14-015, APAFIS#617 and APAFIS#617-2015050516068503 v2). The animal facility is accredited by the French authorities (B9-032-02). All mice were group-housed and maintained in individually ventilated cages with standard enrichment and conventional health status. Mice were housed in a temperature (22 ± 1°C) and humidity-controlled room (50%) on a 12 h light/dark cycle (lights on 7:00) with *ad libitum* access to water and food (Altromin 1310). We used homozygous female 3xTg-AD mice (age range 6-12 months) generated and maintained on a mixed J29/C57BL6 background (RRID:MMRRC_034830-JAX). 3xTg-AD mice express the mutated gene PS1M146V (knock-in) and the mutated human genes APPSwe and tauP301L in the same locus, both under the control of the mouse Thy1.2 regulatory element (Oddo et al., 2003). We also used age-matched NonTg control mice on the same background strain (B6129SF1/J; RRID:IMSR_JAX:101043). Mice with homozygous conditional *Phgdh* alleles (*Phgdh*$^{flox/flox}$) have been previously described (Yang et al., 2010). These mice were produced by introducing two loxP sites flanking exons 4 and 5 and were backcrossed with the C57BL/6J strain for more than 10 generations. We used *Phgdh*$^{flox/flox}$ male mice (age range 3-6 months).

Human Samples

Frozen brain tissue (hippocampus, parahippocampal gyrus and fusiform gyrus) from Controls (n = 5), AD Braak III-IV (n = 4), and AD Braak VI (n = 5) were provided by the GIE NeuroCeb biobank in Paris. Paraffin sections of the same brain area from Controls (n = 6; age average 66.3yr, female and 73.5yr, male), AD Braak III-IV (n = 7; age average 79.4yr, female and 75.5yr, male) and AD Braak VI (n = 8; age average 81.3yr, female and 73.8yr, male) were provided by the Laboratory of Neuropathology at the Hôpital Pitié-Salpêtrière. We did not analyze the influence of sex on our results because of the low number of samples. Previous immunostaining of Tau (AT8, Innogenetics, 1/500) and Aβ (6F/3D, Dako, 1/200) had been performed on all cases. Detailed information on pathology and demographic data are summarized in Table 1. The NeuroCEB brain bank meets the criteria of the French law on biological resources, including consent and data protection (Article L1243-4 of the Public Health Code, August 2007). It has received approval from the Ministry of Higher Education, Research and Innovation to retain human samples and provide them to research teams (CODECOH approval number: AC-2018-3290).

METHOD DETAILS

In Vivo [^{14}C]-2-Deoxyglucose Uptake

We measured [^{14}C]-2-Deoxyglucose (2-DG) uptake in four experimental groups: 6-month-old female 3xTg-AD mice (n = 10), 6-month-old female control mice (n = 9), 12-month-old female 3xTg-AD mice (n = 10), and 12-month-old female control mice (n = 10). Experiments were performed in conscious, lightly restrained animals that were previously habituated to the constraint. Animals fasted for 12 h before the experiment but had free access to water. On the day of the experiment, the mice were anesthetized with isoflurane (2% in O_2) and two catheters were inserted into the femoral artery and vein, respectively. Body temperature was maintained at 37°C. The mice were allowed to recover from anesthesia for 1 h and intravenously injected with [^{14}C]-2DG (16.5 μCi/100 g body weight; Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Glycemia was measured using a DIGL-100 QuantiChrom Glucose Assay Kit. The mice were euthanized by injection of a lethal dose of sodium pentobarbital 45 min after injection. 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 other section was mounted on a coverslip, rapidly heat-dried, and placed against autoradiographic film (Kodak Biomax MR) for 10 days together with radioactive [^{14}C] standards (146C, American Radiochemical Company, St Louis, MO, USA). The sections not used for the autoradiography study were 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 × 42 μm^2) and 1,200 dpi (pixel size 21 × 21 μm^2) 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 a geometrical reference for co-registration (Dubois et al., 2008). The non-rigid registration approach is based on FFD (Free Form Deformation, polynomial model) and has been previously found to be very robust (Lebenberg et al., 2010; Rueckert et al., 1999). Autoradiographic images were converted from gray scale to activity (nCi/g) using the [^{14}C] standards and normalized at 200 nCi/g. A brain template was created using all the anatomic brain volumes at a final resolution of 0.1 × 0.1 × 0.1 mm^3. Regional differences in cerebral glucose uptake between 3xTg-AD and control mice were then assessed using a voxel-wise two-tailed unpaired t test implemented in BrainVISA (Vandenberghe et al., 2016).

Generation of AAVs and Stereotaxic Injection in Mice

The plasmid encoding the sensor Laconic (San Martín et al., 2013) was obtained from Addgene (www.addgene.org). The plasmid encoding Cre-IRES-GFP was kindly provided by Martine Cohen-Salmon. We generated adeno-associated viral vectors (AAV2/9) expressing Laconic, td-Tomato, GFP or Cre-IRES-GFP under the control of the short gfaABC$_1$D promoter. The design, production, and titration of AAV2/9 vectors have been described previously (Berger et al., 2015). Mice were anesthetized with a mixture of ketamine

(150 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Lidocaine (5 mg/kg) was injected subcutaneously under the scalp 5 min before the beginning of surgery. The mice received bilateral stereotaxic injections of AAVs administered by a 10-μl Hamilton syringe via a 34-gauge blunt needle. The stereotaxic coordinates used were as follows: AP - 2 mm; L ± 2 mm; V −1.2 mm with the tooth bar set at 0. Mice received a dose of 10^{10} viral genomes (VG) in a total volume of 2 μl per injection site at a rate of 0.2 μl/min. At the end of the injection, the needle was left in place for 5 min before being slowly removed. The skin was sutured, and the mice were allowed to recover for three to six weeks.

FRET Imaging of Brain Slices

Injections of AAVs in Mice

Five-month old female 3xTg-AD and control mice were injected in the dorsal hippocampus with an AAV2/9 expressing Laconic under the control of the short gfaABC$_1$D promoter and used four to six weeks later.

Slice Preparation

The mice were deeply anesthetized with Ketamine/Xylazine. Heparin (1000 U) was directly injected into the left heart ventricle to prevent blood coagulation, and the mice were perfused transcardially with oxygenated ice-cold sucrose artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 26 mM $NaHCO_3$, 2.5 mM glucose, 25 mM sucrose, and 3 mM kynurenic acid (Sigma) as previously described (Hay et al., 2016). The brains were quickly removed and sagittal slices (300 μm thick) containing the hippocampus were cut with a vibratome (VT1000S; Leica). Slices were allowed to recover 10 min at 37°C in oxygenated sucrose ACSF and then placed at room temperature for 1 h in ACSF saturated with O_2/CO_2 (95%/5%), containing 2.5 mM glucose and 22.5 mM sucrose. The slices were transferred to a submerged recording chamber and perfused with oxygenated ACSF lacking kynurenic acid.

Fluorescence Imaging

Two-photon images were obtained with a custom-built 2-photon laser scanning microscope based on an Olympus BX51WI upright microscope (Olympus) with a 40X (0.8 NA) water-immersion objective and a titanium:sapphire laser (MaiTai HP; SpectraPhysics) tuned at 850 nm for mTFP excitation. Galvanometric scanners (model 6210; Cambridge Technology) were used for scanning, and a piezo-driven objective scanner (P-721 PIFOC; Physik Instrumente GmbH) was used for z stack image acquisition. A two-photon emission filter was used to reject residual excitation light (E700 SP; Chroma Technology). A fluorescence cube containing 479/40 and 542/50 emission filters and a 506-nm dichroic beam splitter (FF01-479/40, FF01-542/50 and FF506-Di02-25x36 Brightline Filters; Semrock) was used for the separation of the mTFP and Venus signals. Two imaging channels (H9305 photomultipliers; Hamamatsu) were used for simultaneous detection of the two types of fluorescence emission. An image stack of 10 to 20 images with a 1-μm interval was acquired every 30 s. Occasional x, y, and z drifts were corrected using custom macros developed from ImageJ plugins TurboReg,StackReg, MultiStackReg and Image CorrelationJ. mTFP and Venus fluorescence intensities were measured at the soma of astrocytes. Fluorescence ratios (R) were calculated by dividing the mean mTFP intensity of a given ROI by the mean Venus intensity of the same ROI. The ratios were normalized to the baseline ratio (R0) calculated in the same ROI during the 10-min prior to the application of AR-C155858 (1μM). Cells exhibiting a baseline with a slope smaller than 0.5%.min-1 were considered to be stable and further analyzed. Effect of monocarboxylate transporter blockade was quantified by averaging the normalized ratio (R/R0) during the last five minutes of drug application.

Electron Microscopy

Six-month-old female mice (3 control and 3xTg-AD) were euthanized with an overdose of pentobarbital and immediately perfused, via the heart, with a buffered mix of 2.5% glutaraldehyde and 2.0% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were then removed and stored overnight in PBS at 4°C. Coronal vibratome sections were cut at 80 microns thickness, post-fixed in potassium ferrocyanide (1.5%) and osmium (2%), then stained with thiocarbohydrazide (1%) followed by osmium tetroxide (2%). They were then stained overnight in uranyl acetate (1%), washed in distilled water at 50°C, before being stained with lead aspartate at the same temperature. They were finally dehydrated in increasing concentrations of alcohol and then embedded in Spurs resin and hardened at 65 degrees for 24 h between glass slides. The regions containing the hippocampal region CA1 were trimmed from the rest of the section using a razor blade and glued to an aluminum stub and mounted inside scanning electron microscope (Zeiss Merlin, Zeiss NTS). Serial sections were cut from the face using an ultramicrotome mounted in the microscope (Gatan, 3View) and the block face imaged after every cut using a beam voltage of 1.7 kV and pixel size of 6 nm with a dwell time of 1 microsecond. Series of 200 – 300 sections were collected, aligned in the FIJI imaging software (www.fiji.sc) and synapses counted in the TrakEM2 plugin. Synapses were counted through discrete volumes through the series of images and classified according to their morphology. Asymmetric synapses were presumed excitatory (glutamatergic) and symmetric, inhibitory (GABAergic). A total of 1067 synapses were counted in the 3xTg-AD mice and 1094 in the controls.

Immunohistochemistry of Human Brain Samples

Immunohistochemistry was performed on a VENTANA Discovery XT automated staining instrument according to the manufacturer's instructions. All solutions were from Roche Diagnostics (Meylan, France). Briefly, slides were de-paraffinized using EZprep solution for 30 min at 75°C, followed by epitope retrieval with RiboCC solution for 20 min at 95°C. Primary rabbit polyclonal PHGDH antibody (Frontier Institute, Hokkaido, Japan) was diluted with the provided Discovery Ab Diluent at 1:300 and applied manually. Slides were developed using the DABMap detection kit, counterstained with hematoxylin II for 8 min, washed, dehydrated, and coverslipped.

Labeled slides were scanned using a NanoZoomer Digital slide scanner (Hamamatsu Photonics, Massy, France) at the Imaging platform of the Institut de la Vision in Paris.

Immunofluorescence Staining of Mouse Brain

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). The brains were cryoprotected in a 30% sucrose solution in PB for 24 h. Sagittal and coronal brain sections (35 μm) were cut on a freezing microtome, serially collected, and stored at −20°C until analysis. The slices were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma) and blocked with 4.5% normal goat serum (Sigma) for 30 min and were incubated overnight at room temperature (RT) with the following primary antibodies: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:1000, rabbit; Dako), PHGDH (1:500, guinea pig or rabbit; Frontier Institute), NeuN (1:500, mouse; Chemicon), IBA1 (1:1000, rabbit; Dako) or Olig2-Alexa 488 (1:500, rabbit; Millipore). After rinsing, the brain slices were incubated for 3 h at RT with fluorescent secondary 488 and 594 Alexa Fluor-conjugated antibodies (Invitrogen) and mounted with FluorSave reagent (Calbiochem). Images were acquired by confocal microscopy (Leica SP8) and analyzed using Fiji (http://fiji.sc/Fiji).

Immunohistochemistry of Mouse Brain

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), and HT7 (1:500, mouse, Innogenetics) for 48 h at 4°C. After rinsing, the brain slices were incubated with biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories) for 1 h at RT. Finally, they were incubated with the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) and revealed with the DAB kit (Vector Laboratories). Antigen retrieval with formic acid (70% for 2 min) was performed for the 4G8 antibody.

Sholl Analysis

Analysis of the astrocyte ramification was performed from stacked confocal images (13 steps; z-step 1 μm, maximum intensity stack) acquired with the 40X objective, zoom 2 (pixel size of 0.284 × 0.284 μm^2). 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 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 (1-μm increased radius of each ring) from the center. 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.

Immunoblotting of Human Brain Samples

Samples were homogenized using a sonicator in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1% SDS with protease (Roche) and phosphatase (Sigma) inhibitor cocktails. The protein concentration was determined by the BCA method. Four serial dilutions were prepared for each protein sample in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl. Samples were further diluted in NuPAGE LDS sample buffer with NuPAGE Sample Reducing agent (Invitrogen), boiled for 10 min at 90°C, loaded on a 4%–20% Criterion TGX Stain-free gel (Bio-Rad Laboratories), separated, and transferred to a nitrocellulose membrane using a Trans-Blot® Turbo transfer device (Bio-Rad Laboratories). The membranes were blocked in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and 5% milk for 1 h at RT and then incubated overnight at 4°C with PHGDH antibody (1:10000, Frontier Institute) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and 5% milk. After rinsing, the membrane was incubated with a fluorescent secondary antibody (1:5000, IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG, LI-COR Biosciences) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and 5% milk for 1 h. Antibody binding was detected using an Odyssey® CLX imaging system (LI-COR Biosciences). Band intensity was measured using Image Studio 5.2 software. To avoid using housekeeping proteins, a significant source of confusion in quantitative immunoblotting, and to confirm that our experimental conditions lead to a linear response according to the amount of proteins that was loaded, we designed a protocol using four serial dilutions as previously described (Janes, 2015; McDonough et al., 2015). The slope was determined for each sample from four dilutions by linear regression.

Immunoblotting of Mouse Brain Samples

Phgdh$^{flox/flox}$ mice injected with AAVs expressing either GFP or Cre-IRES-GFP were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital. The brains were rapidly collected and sliced into 1-mm thick coronal sections with a brain matrix and the hippocampus was dissected out. The samples were then homogenized using a sonicator in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1% SDS, with protease (Roche) and phosphatase (Sigma) inhibitor cocktails. Samples were processed as for the human samples.

RNA Extraction and qRT-PCR

Mice were euthanized under pentobarbital anesthesia. The brains were rapidly collected and the hippocampus dissected out on ice. Total RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen). Reverse transcription (RT) was performed with 350 ng total RNA using Superscript III VILO reverse transcriptase (Invitrogen). Complementary DNA (7 ng) was processed for qRT-PCR on a Mastercycler® ep realplex machine (Eppendorf). PCR products were quantified by measuring the incorporation of SYBR green fluorescent dye (Master Mix, Invitrogen). The primers used were as follows: *phgdh* 5′-AAGTTCATGGGGACAGAGCTGAAC-3′ (forward) and

5′-CCTTCACCATGTCCACAAACTGGA-3′ (reverse); *gfap* 5′-ACGACTATCGCCGCCAACT-3′ (forward) and 5′-GCCGCTCTAGG GACTCGTTC-3′ (reverse); *vimentin* 5′-TCGAGGTGGAGCGGGACAAC-3′ (forward) and 5′-TGCAGGGTGCTTTCGGCTTC-3′ (reverse); *rbfox3* (Neun) 5′-CAACTCCACCCTTCCGACCC-3′ (forward) and 5′-TCCCGAATTGCCCGAACAT-3′ (reverse); *slc1a1* (eaat3) 5′-ATGTGCTACATGCCGATTGG-3′ (forward) and 5′-CTCAGGACAGTGGCCATGTAAA-3′ (reverse), *cd68* 5′-GCCAGCCC TACGACCAG-3′ (forward) and 5′-TGGTGGTGGCAGGGTTATGA-3′ (reverse); *iba1* 5′-CCAGCCTAAGACAACCAGCGTC-3′ (forward) and 5′-GCTGTATTTGGGATCATCGAGGAA-3′ (reverse); *ppia (*cyclophiline A) 5′-ATGGCAAATGCTGGACCAAA-3′ (forward) and 5′-GCCTTCTTTCACCTTCCCAAA-3′ (reverse); *daao* 5′- GGTGGCAAGAGGAGTGGAT-3′ (forward) and 5′- GATGATGTACGGAGA GTTGTAGATA-3′ (reverse). Relative expression was assessed using the ΔΔCt calculation.

Microdialysis

Age matched control and 3xTg-AD mice received a unilateral cannula implantation surgery. Briefly, mice were anesthetized using ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Buprenorphine (0.05 mg/kg, subcutaneous) was given pre-operative as well as lidocaine (0.5% in water, 50μl subcutaneous at the level of the scalp). Mice were fixed in a stereotaxic frame, the skull was exposed, cleaned, and a bonding agent (OptiBond® FL) was applied. A guide cannula (CMA P000138) was inserted above the CA1 region of the hippocampus (coordinates: AP, −2 mm; L, 2 mm from bregma; V, 0.5 mm from dura) and sealed in place with a photopolymerizable dental cement (Tetric EvoFlow®). Mice recovered 4-7 days before sampling. Mice were habituated to the polycarbonate enclosure (STANK/WF, Instech) for 3 days. On the day of sampling (usually at 1 pm), a microdialysis probe (CMA 7, 1mm cuprophane (6KD), CMA P000082) was inserted through the guide cannula. Probes were perfused with aCSF (147 mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.2 mM $CaCl_2$, and 0.85 mM $MgCl_2$) at a rate of 1 μl/min for 24 h. Dialysis samples were collected every h using a refrigerated fraction collector (MAB85, MBT) and frozen at −80C before analysis. Cannula implantation was verified at the end of the experiments using Nissl staining.

Determination of L- and D-serine

We used two different analytical methods to determine the extracellular concentrations of L- and D-serine following microdialysis. Only data obtained using LC-MS/MS are presented in the manuscript.

Capillary Electrophoresis Coupled to Laser-Induced Fluorescence (CE-LIF)

Ten μL of sample were mixed with 37.5 μL of 10 mM sodium borate buffer pH 10 containing 5 μM cysteic acid, as internal standard, and 6 μL of the derivatization solution containing 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) at 2.5 mg/mL and 250 μM hydrochloric acid in methanol / water (50/50 v/v). The mixture was heated at 65°C for 30 min and the samples kept at 7 ± 2°C in the CE autosampler until analysis. Quantitative analysis of L-serine was performed using Capillary Electrophoresis coupled to Laser-induced Fluorescence detection as previously described (Lorenzo et al., 2013). Capillary electrophoresis experiments were carried out using a PA800 plus instrument (Sciex, formerly Beckman Coulter, Redwood City, 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. Data acquisition and instrument control were carried out using 32 KaratTM system software version 7.0 (Sciex). Electrophoretic conditions were: 175 mM borate buffer pH 10.25 and 12.5 mM β-cyclodextrin for the electrolyte. Separation was performed in a 50 cm x 75 μm Id silica capillary at 21 kV and at 25°C.

LC-MS/MS

We used high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) for the simultaneous determination of extracellular D-serine, L-serine and L-glutamate (Sugimoto et al., 2015). The LC-MS/MS system consisted of an UPLC Acquity I-CLASS and a Xevo-TQ-XS triple quadruple mass spectrometer (Waters SAS, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with an ESI interface. The CROWNPAK CR-I(+) column (5 μm, 3 mmID, 150 mm) Daicel Corporation, Tokyo, Japan) was used for the chiral chromatographic separation in a container cooled between 0 and +1°C during the analysis. The mobile phase consisted of 0.3% trifluoroacetic acid in 10% acetonitrile. The flow rate of the mobile phase was 0.15 mL/min with an isocratic mode. The samples were diluted (1/2) in the mobile phase and 10 μL was injected in the LC-MS/MS system. In these conditions, retention times were 4.60, 4.82 and 11.0 min for D-serine, L-serine and L-glutamate, respectively. Precursor-product ion pair transitions were chosen for a multiple reaction monitoring in positive ionization mode.

HPLC

Total amino acid concentrations were measured by preparing hippocampal homogenates from mice anesthetized with a lethal dose of sodium pentobarbital. Tissues were weighed, homogenized, and centrifuged. Proteins in the supernatant were removed by adding 5% perchloric acid. Samples were derivatized with a fluorescent labeling reagent, 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. Amino acids were separated using HPLC and fluorescence of the derivatized amino acids was detected at 530 nm with excitation at 470 nm as previously described (Esaki et al., 2011).

Microelectrode Biosensor Recordings

We measured extracellular D-serine concentrations *in vivo* in anesthetized $Phgdh^{flox/flox}$ mice using microelectrode biosensors. They were prepared at the AniRA-Neurochem Technological platform (Lyon, France) as previously described (Pernot et al., 2008; Vasylieva et al., 2011). Biosensors were calibrated with D-serine in PBS (0.01 M, pH 7.4) before and after *in vivo* recordings, and their selectivity was verified by the absence of detection of serotonin (20-40 μM). Mice were anesthetized using ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), an Ag/AgCl reference electrode was placed under the skin of the neck, and the biosensor implanted in the hippocampus (AP - 2 mm; L ± 2 mm; V −1.2 mm from Bregma). A control biosensor coated with bovine serum albumin was inserted ~100μm away

from the D-serine biosensor to record background current. Amperometric recordings were performed for 1 h and the current recorded by the control biosensor was subtracted from that recorded by the D-serine biosensor in order to estimate the specific D-serine current, and hence its extracellular concentration.

Electrophysiology

Slice Preparation

Experiments were carried out on adult mice (six to seven 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 ACSF saturated with 95% O_2 and 5% CO_2. ACSF was used for dissection, slicing, and recording. The ACSF composition was: 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4, 1.3 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 26 mM $NaHCO_3$, and 10 mM glucose (pH 7.3, 300-305 mOsm/kg). A block of tissue containing the hippocampus was prepared and hippocampal sagittal slices (350 μm) were cut using a vibratome (Leica, VT1200S, Germany). The slices were incubated 30 min at 32°C and then allowed to recover for at least one h at room temperature.

Field Recordings

For electrophysiological recordings, the 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 μM) added to the ACSF just before recording. 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 MΩ) filled with ACSF and placed in the stratum radiatum of the CA1 area, close to the subiculum. NMDA fEPSPs were isolated with low Mg^{2+} ACSF (0.2 mM) in the presence of picrotoxin (100 μM) and 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione (NBQX) (10 μM) to block $GABA_A$ and AMPA/kainate receptors, respectively. Synaptic potentials were evoked at 0.05 Hz by orthodromic stimulation (100 μs) of Schaffer collaterals using either a glass pipette filled with ACSF or a bipolar tungsten stimulating electrode placed in the stratum radiatum > 200 μm away from the recording electrodes. LTP was induced by applying a high-frequency stimulation (HFS) protocol (100 Hz train of stimuli for 1 s, repeated four times at 20 s intervals) performed in current clamp mode. LTD was induced by applying a low frequency stimulation protocol (LFS) consisting in a 1-Hz train of stimuli applied for 30 min. The change in the slope of the fEPSP was evaluated 50-60 min post-HFS or post-LFS, and normalized to the slope measured during the 10 min immediately before HFS or LFS. L-serine (50 μM) and D-serine (50 μM) were bath applied 20 min before the recording and then during the whole experiment of long-term synaptic plasticity. Average fEPSP traces presented in figures were obtained from 10 min of recordings. Signals were filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz via a DigiData 1322 interface (Axon Instruments, Inc.). Data were collected and analyzed offline using pClamp 9 software (Axon Instruments Inc.).

Behavioral Analyses

Elevated Plus-maze

The apparatus consisted of four arms elevated 40 cm above floor level. Two of the arms contained 15 cm-high walls (enclosed arms) and the other two none (open arms). Each mouse was placed in the middle section facing an open arm and left to explore the maze for a single 5-min session. The time spent in open and closed arms and the duration of head-dipping into open arms were analyzed using a video-camera and a video-tracking system (Ethovision, Noldus Information Technology Inc.).

Spontaneous Motor Behavior

We used the PhenoTyper® chamber (Noldus Information Technology Inc.) to monitor the spontaneous motor behavior of mice for 47 h. A video-tracking system was used to collect behavioral data during this period.

Morris Water Maze

Experiments were performed in a circular tank filled with water and equipped with a 10-cm diameter platform submerged 0.5 cm beneath the surface of the water. Visual clues were positioned around the pool, to provide the mouse with spatial landmarks, and luminosity was maintained at 400 lux. The mice were initially exposed to a learning phase, which consisted of daily sessions (three trials per session) on five consecutive days. The starting position varied between the four cardinal points for each trial. A mean interval of 30 min was left between trials. The trial was stopped when the animal reached the platform. A 60 s cutoff was used, after which the mice were gently guided to the platform. Once on the platform, the animals were allowed to rest for 30 s before being returned to their cage. Long-term spatial memory was assessed 72 h after the last training trial (fifth day) in a probe trial in which the platform was removed. The position of the animals was monitored by a video-tracking system (Ethovision, Noldus Information Technology Inc.) for 60 s.

Supplementation of L- or D-serine

Phgdh$^{flox/flox}$, 3xTg-AD and control mice were placed on a rodent diet (Altromin 1324) enriched with 10% L-serine (w/w) for two months (Garofalo et al., 2011) including the period of the Morris water maze test. Two other groups of 3xTg-AD and control mice were given D-serine (600 mg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the drinking water for two weeks, including the period of the Morris water maze test. This protocol resulted in a daily dose of approximately 100 mg/kg D-serine per body weight (average weight: 30 g, average drinking volume: 5 mL/day).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSES

No statistical methods were used to determine sample sizes but our sample sizes (4 to 10) are similar to those generally employed in the field. Randomization was not employed. Investigators that performed electrophysiological recordings were blinded to group allocation. Other experiments were not performed blind to group allocation. For each analysis, normality of residues and homoscedasticity were assessed. Data are presented as the mean ± SEM. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Statistica, R or Prism software. We used the nonparametric Mann-Whitney U test for comparison between two groups and the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn post doc test for multiple comparisons between groups. Other specific statistical tests are mentioned in the figure legends.

DATA AND CODE AVAILABILITY

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Cell Metabolism, Volume *31*

Supplemental Information

Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease

Juliette Le Douce, Marianne Maugard, Julien Veran, Marco Matos, Pierrick Jégo, Pierre-Antoine Vigneron, Emilie Faivre, Xavier Toussay, Michel Vandenberghe, Yaël Balbastre, Juliette Piquet, Elvire Guiot, Nguyet Thuy Tran, Myriam Taverna, Stéphane Marinesco, Ayumi Koyanagi, Shigeki Furuya, Mylène Gaudin-Guérif, Sébastien Goutal, Aurélie Ghettas, Alain Pruvost, Alexis-Pierre Bemelmans, Marie-Claude Gaillard, Karine Cambon, Lev Stimmer, Véronique Sazdovitch, Charles Duyckaerts, Graham Knott, Anne-Sophie Hérard, Thierry Delzescaux, Philippe Hantraye, Emmanuel Brouillet, Bruno Cauli, Stéphane H.R. Oliet, Aude Panatier, and Gilles Bonvento

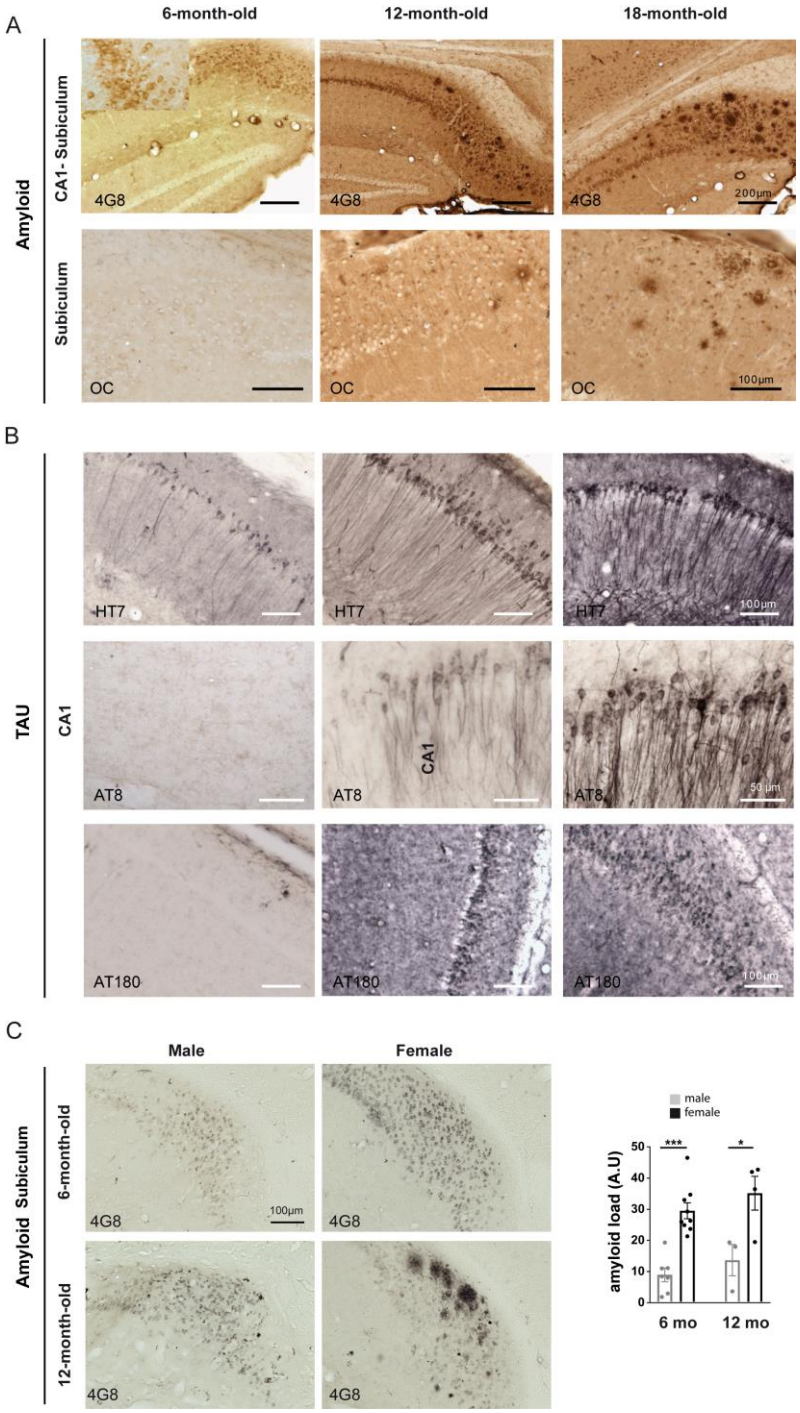


Figure S1. Related to Figure 1. Anatomopathological evaluation of 3xTg-AD mice

(**A**) Brain sections of 6, 12, and 18-month-old 3xTg-AD female mice immunostained with 4G8 or OC antibodies. Progression of the amyloid pathology is slow, and whereas intraneuronal Aβ was already present in 6 month-old 3xTg-AD mice (see insert), oligomers and extracellular plaques were detected mostly in the subiculum and not in the CA1 region of the hippocampus in 12 and 18 month-old 3xTg-AD mice. (**B**) Tangential brain sections of 6, 12, and 18-month-old 3xTg-AD mice immunostained with HT7, AT8, or AT180 tau antibodies. (**C**) Tangential brain sections of 6 and 12-month-old 3xTg-AD male and female mice immunostained with 4G8 showing a more aggressive AD phenotype in the female relative to that of the male in the 3xTg-AD mouse model (one-way ANOVA, $p<0.001$, 6-month-old and $p=0.01$, 12-month-old).

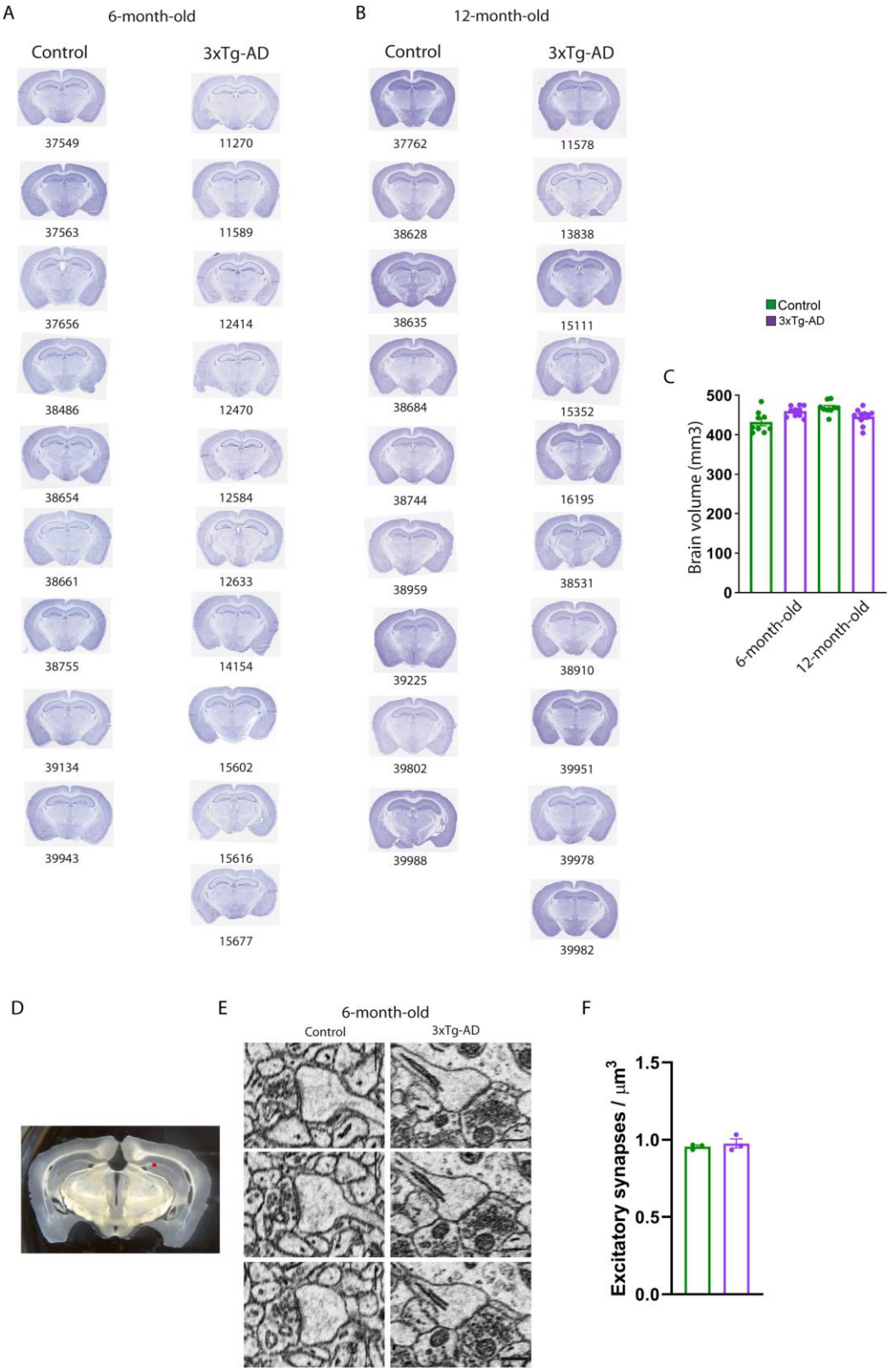


Figure S2. Related to Figure 1. No significant neurodegeneration and no change in CA1 synapse density in 3xTg-AD mice

(**A**) Typical examples of Nissl stained brain sections in all 6-month-old 3xTg-AD and control mice used for *in vivo* glucose metabolism (numbers correspond to the identification of mice). (**B**) Typical examples of Nissl stained brain sections in all 12-month-old 3xTg-AD and control mice used for *in vivo* glucose

metabolism. No significant cell loss was observed in 3xTg-AD mice. (**C**) Brain volume was not significantly different between the four groups of mice (Kruskal-Wallis). (**D**) The red square illustrates the brain region that was analyzed by electron microscopy (EM). To count synapses in stacks of serial EM images (three control and three 3xTg-AD mice), circles were placed at the center of each synapse using the TrakEM2 plug-in in FIJI (www.fiji.sc); Synapses were classified according to their morphology as either asymmetric (presumed glutamatergic) or symmetric (presumed GABAergic). (**E**) Micrographs showing asymmetric synapses on three consecutive planes separated by 50 nm each. (**F**) The density of excitatory synapses was not significantly different between 6-month-old control (0.956 ± 0.012 per μm^3, total of 1067 synapses) and 3xTg-AD mice (0.976 ± 0.036 per μm^3, total of 1094 synapses). Scale bar in E is 500 nanometers.

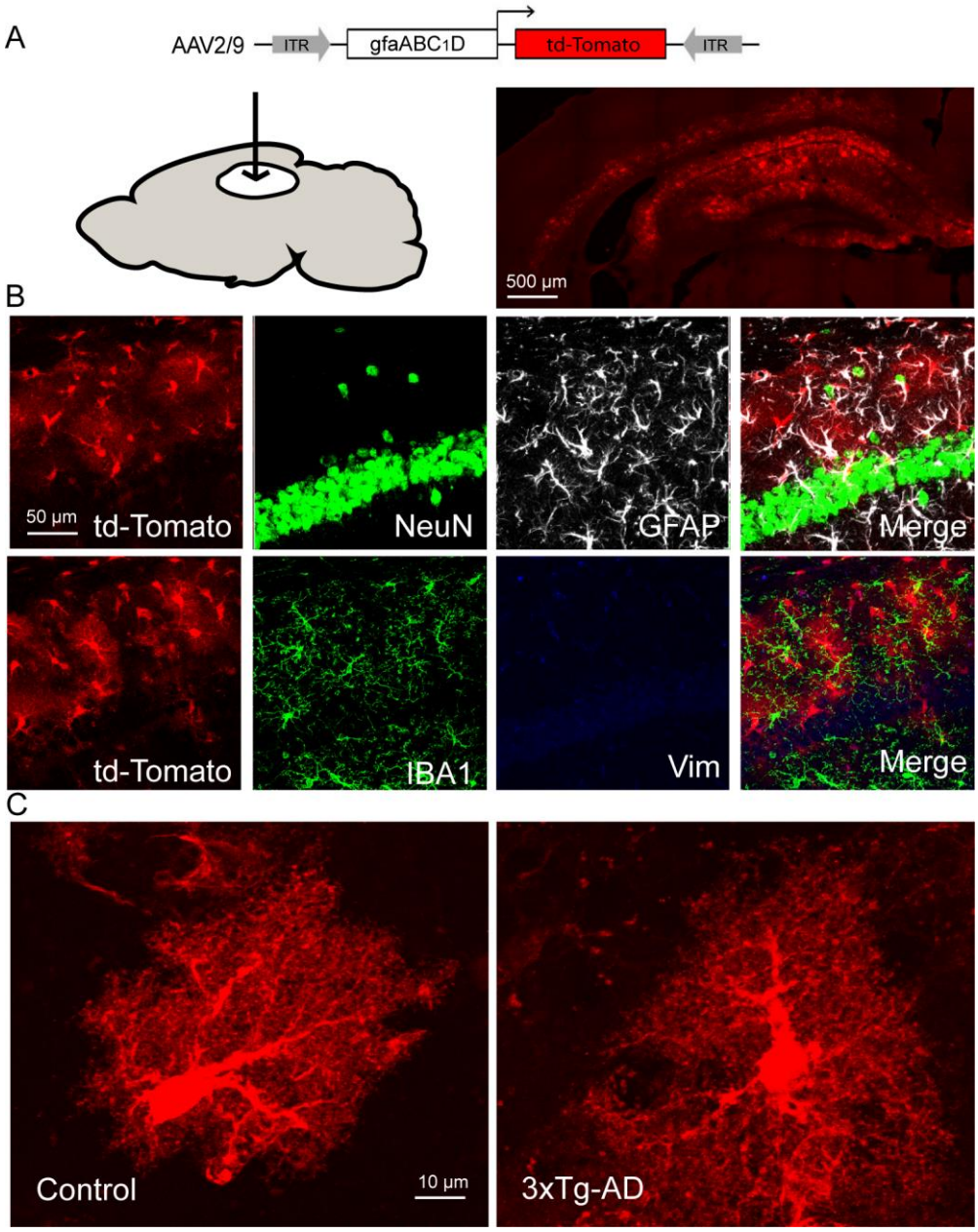


Figure S3. Related to Figure 1. Cellular tropism of AAV2/9 expressing td-Tomato driven by the short gfaABC$_1$D promoter

(**A**) Three weeks after injection of the AAV2/9 expressing td-Tomato driven by the short gfaABC$_1$D promoter, td-Tomato was widely expressed into the hippocampus. (**B**) td-Tomato was expressed in GFAP-positive astrocytes but not in NeuN-positive (neurons) or IBA1-positive (microglia) cells. No vimentin staining was observed, indicating that astrocytes did not adopt a reactive phenotype. (**C**) AD astrocytes did not display major hypertrophy in the CA1 region of 6-month-old female mice.

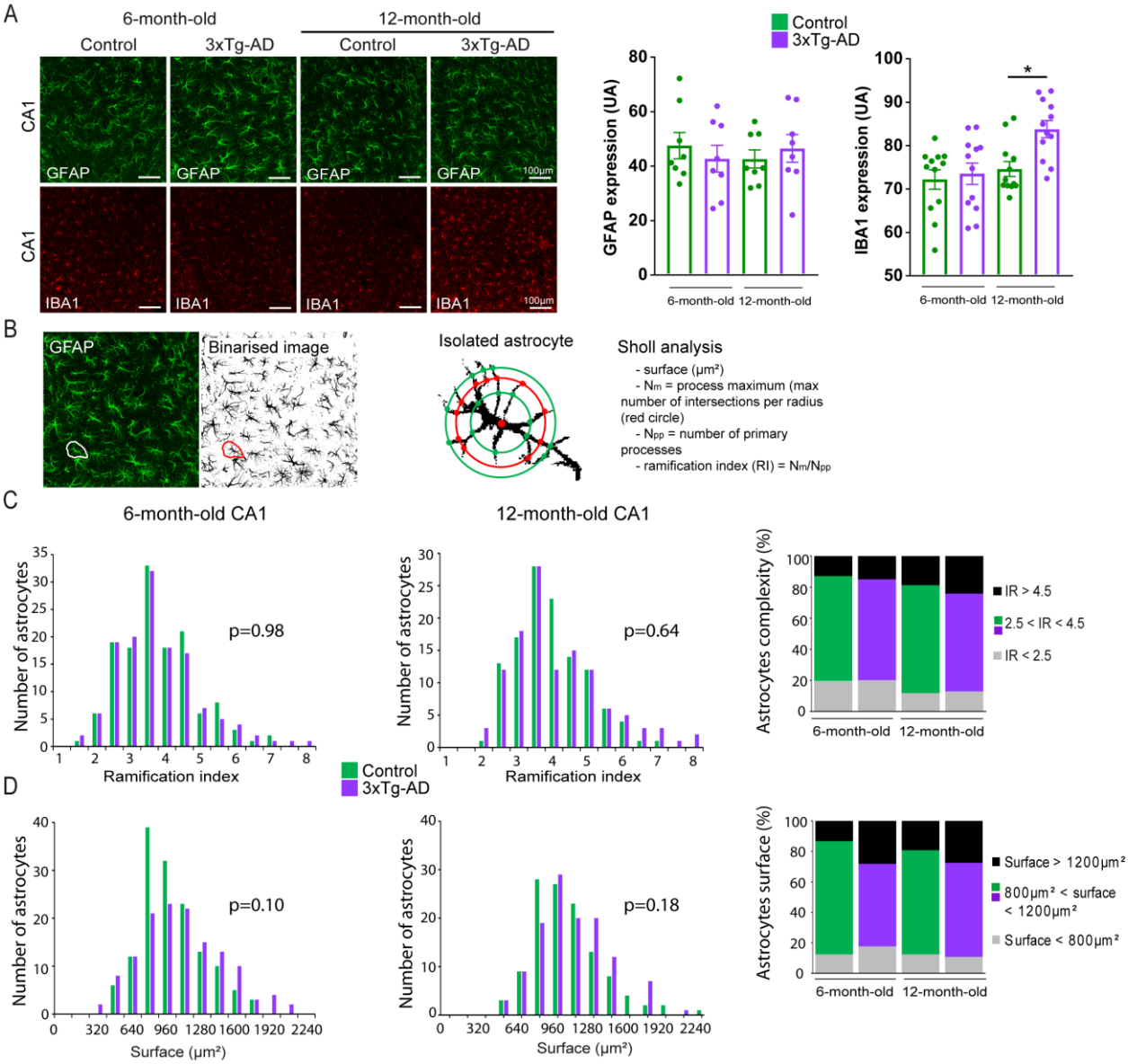


Figure S4. Related to Figure 1. No astrocyte reactivity in the CA1 region of 3xTg-AD mice

(**A**) Immunofluorescent staining of 6 and 12-month-old control and 3xTg-AD mouse brain using GFAP and IBA1 antibodies. The global expression of GFAP, quantified using Fiji, was unaltered in the CA1 region at both ages. The expression of IBA1 was significantly higher only in 12 month-old 3xTg-AD mice (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test, p=0.029). (**B**) Illustration of Sholl analysis performed on a binarized image taken from a GFAP immunostaining. Astrocytes were manually outlined and the Sholl analysis was performed using Fiji. Sholl analysis generates several parameters such as the surface, the Nm (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 Sholl analysis. (**C, D**) The distribution of the ramification index and the surface was similar for all groups (Chi² test), indicating that astrocytes in the CA1 region of 6 and 12-month-old 3xTg-AD mice were not reactive.

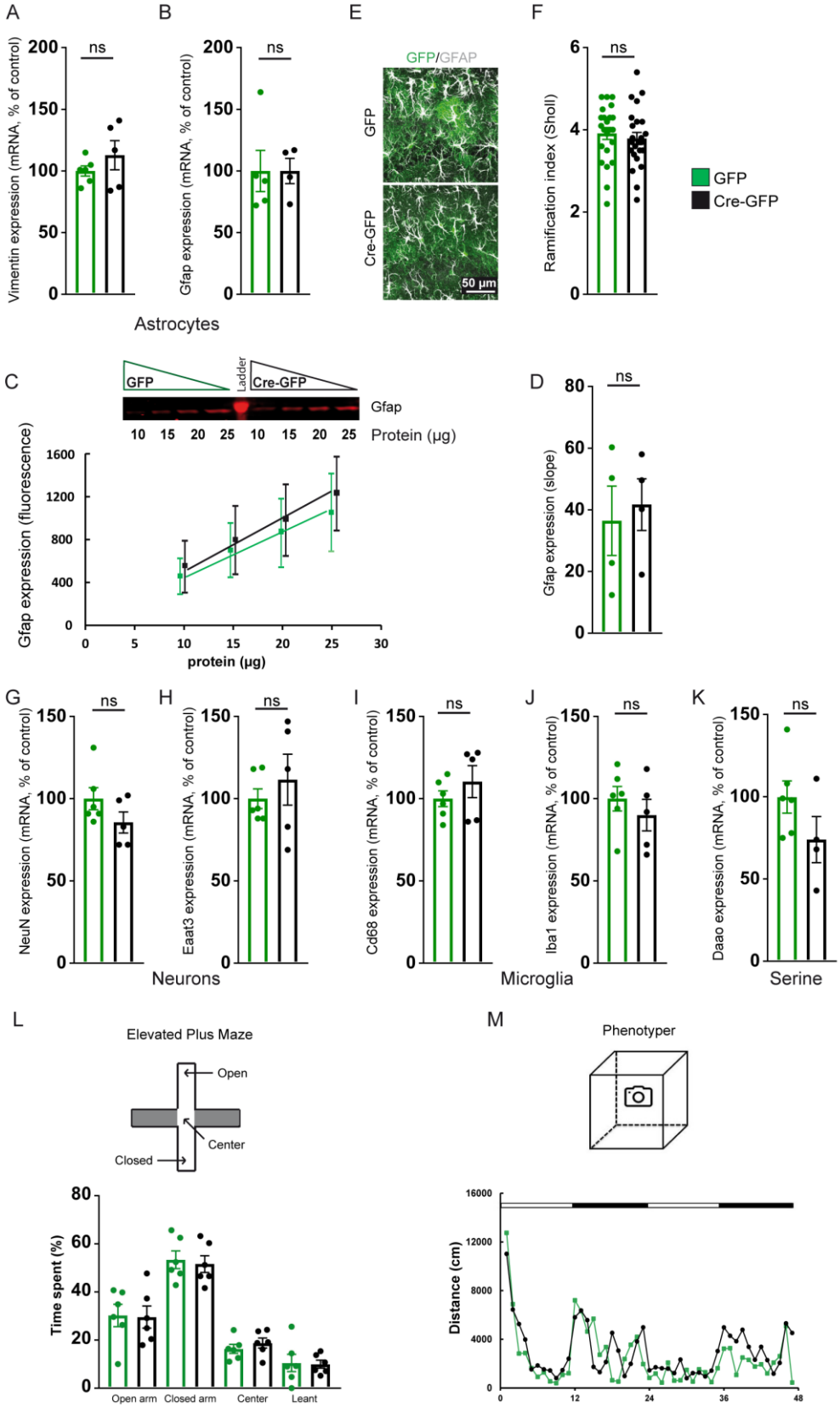

A
B
E
F
ns
Vimentin expression (mRNA, % of control)
Gfap expression (mRNA, % of control)
GFP/GFAP
GFP
Cre-GFP
50 µm
Ramification index (Sholl)
GFP
Cre-GFP
Astrocytes
C
D
GFP
Ladder
Cre-GFP
Gfap
Protein (µg)
Gfap expression (fluorescence)
protein (µg)
Gfap expression (slope)
G
H
I
J
K
NeuN expression (mRNA, % of control)
Eaat3 expression (mRNA, % of control)
Cd68 expression (mRNA, % of control)
Iba1 expression (mRNA, % of control)
Daao expression (mRNA, % of control)
Neurons
Microglia
Serine
L
M
Elevated Plus Maze
Open
Center
Closed
Phenotyper
Time spent (%)
Open arm
Closed arm
Center
Leant
Distance (cm)

Figure S5. Related to Figure 3. Phgdh deletion does not induce major side-effects on astrocytes, neurons and microglia and does not alter anxiety or spontaneous motor behavior

(**A,B**) mRNA expression of astrocytic genes quantified by RT-qPCR (Mann-Whithney U-test p=0.43 for vimentin and p=0.19 for gfap; n=6 hippocampus per group). (**C**) GFAP fluorescent immunoblots for serial dilutions of protein extracts and fluorescence quantification for each dilution. (**D**) GFAP protein quantification using the slopes determined on c (Linear model p=0.82; n=4 animals per group). (**E**) GFP labelling (green) identified infected astrocytes on hippocampal sections. GFAP labeling (white) was used to quantify process ramification. (**F**) Ramification index determined by Scholl analysis (Nested model p=0.69; n=2 animals per group and 30 astrocytes per animal). (**G-K**) mRNA expression of neuronal and microglial genes quantified by RT-qPCR (Mann-Whithney U-test p=0.23 for NeuN, p=0.82 for eaat3, p=0.43 for Cd68, p=0.35 for Iba1 and p=0.17 for Daao; n=4-6 hippocampus per group). (**L**) The time spent in open and closed arms and the duration of head-dipping into open arms in the elevated plus maze were not significantly different between Cre (black) and GFP-injected mice (green) (Mann-Whithney U test, p>0.05, n=6 animals per group). (**M**) The spontaneous motor behavior recorded during 47h (white bar, day; black bar, night) was not significantly different between Cre (black) and GFP-injected mice (green), MANOVA, p=0.79, n=3 animals per group).

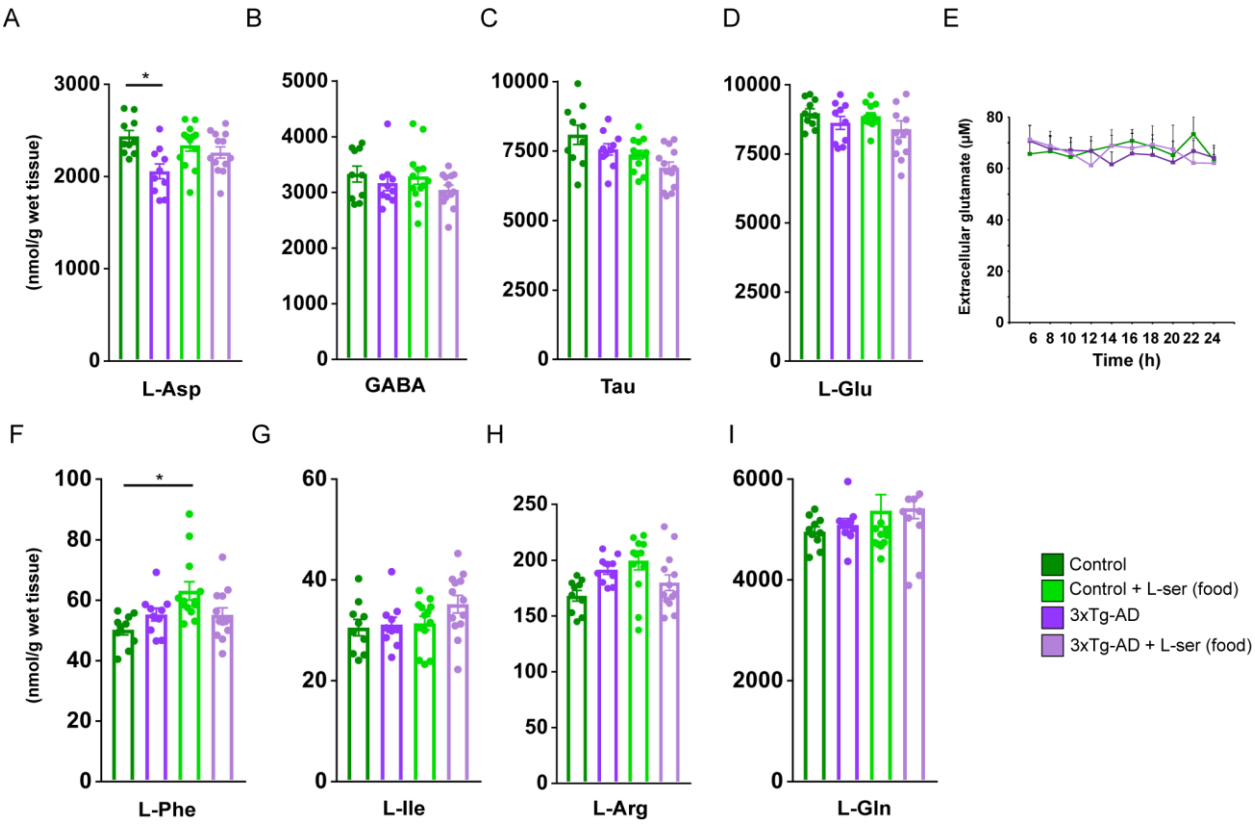


Figure S6. Related to Figures 1 and 5. Effect of a 2-month diet enriched in L-serine (10%) on the concentration of several amino acids in the hippocampus of control and 3xTg-AD mice

(**A-I**) Total levels of L-aspartate (L-Asp), GABA, Taurine (Tau), L-glutamate (L-Glu), L-phenylalanine (L-Phe), L-isoleucine (l-Ile), L-arginine (L-Arg) and L-glutamine (L-Gln) were measured by HPLC in the hippocampus of 6-month-old female control and 3xTg-AD mice that received or not a diet enriched in L-serine (10%) for 2 months (n=10-13 mice per group). Kruskal-Wallis followed by Dunn's test if necessary: (L-Asp) p=0.017; (L-Phe) p=0.002.

(**E**) Extracellular levels of L-glutamate were similar between 6-month-old female control and 3xTg-AD mice with and without L-serine diet, as measured by LC-MS/MS following microdialysis in the hippocampus.

COMMUNICATION 3. L-SERINE LINKS METABOLISM WITH NEUROTRANSMISSION

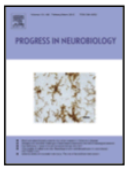
Publié le 9 août 2020 dans *Progress in Neurobiology*.

Progress in Neurobiology xxx (xxxx) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neurobiology

journal homepage: http://ees.elsevier.com



Review article

L-Serine links metabolism with neurotransmission

Marianne Maugard [a,1], Pierre-Antoine Vigneron [a,1], Juan P. Bolaños [b,c], Gilles Bonvento [a,*]

[a] Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRCen, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses, France
[b] Institute of Functional Biology and Genomics (IBFG), Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, Spain
[c] Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Institute of Biomedical Research of Salamanca, 37007, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Keywords
astrocytes
glycolysis
synaptic plasticity
D-serine
phosphorylated pathway
phosphoglycerate dehydrogenase

ABSTRACT

Brain energy metabolism is often considered as a succession of biochemical steps that metabolize the fuel (glucose and oxygen) for the unique purpose of providing sufficient ATP to maintain the huge information processing power of the brain. However, a significant fraction (10–15 %) of glucose is shunted away from the ATP-producing pathway (oxidative phosphorylation) and may be used to support other functions. Recent studies have pointed to the marked compartmentation of energy metabolic pathways between neurons and glial cells. Here, we focused our attention on the biosynthesis of L-serine, a non-essential amino acid that is formed exclusively in glial cells (mostly astrocytes) by re-routing the metabolic fate of the glycolytic intermediate, 3-phosphoglycerate (3PG). This metabolic pathway is called the phosphorylated pathway and transforms 3PG into L-serine via three enzymatic reactions. We first compiled the available data on the mechanisms that regulate the flux through this metabolic pathway. We then reviewed the current evidence that is beginning to unravel the roles of L-serine both in the healthy and diseased brain, leading to the notion that this specific metabolic pathway connects glial metabolism with synaptic activity and plasticity. We finally suggest that restoring astrocyte-mediated L-serine homeostasis may provide new therapeutic strategies for brain disorders.

1. Introduction

L-serine, one of the most frequent amino acids found in the protein of vertebrates, was first discovered in nature, specifically in silk protein, by German chemist Emil Cramer in 1865 (De Koning et al., 2003). L-serine was initially classified as nutritionally non-essential (dispensable) for humans and animals. From both a functional and a metabolic perspective, L-serine is however a very important amino acid. It is the precursor of other nonessential amino acids such as glycine and cysteine given that its rate of synthesis is high enough to enable its secondary conversion (Reeds, 2000). L-serine was known for a long time to sustain cell proliferation (Eagle, 1959) as its supplementation can increase cell growth more efficiently than any other amino acid. Increased L-serine biosynthesis is one amongst many numerous metabolic changes that have been reported in cancer cells and it is now recognized that a great number of solid tumor cancer cells are highly dependent on L-serine availability (Mattaini et al., 2016; Possemato et al., 2011). This is mainly due to the fact that L-serine and glycine are critical players of the one-carbon metabolism, a complex metabolic process that generates building blocks for new cellular components, including proteins, lipids and nucleic acids (Locasale, 2013; Yang and Vousden, 2016). L-serine metabolism is now considered as a putative target in oncology and inhibitors of the metabolic pathways leading to L-serine biosynthesis could offer new therapeutic opportunities (Mullarky et al., 2016; Pacold et al., 2016).

Abbreviations: 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; 3PHP, 3-phosphohydroxypyruvate; 3PS, 3-phosphoserine; 5, 10-MTHF, 5,10-methylenetetrahydrofolate; α-KG, α-ketoglutarate; AATs, amino acid transporters; AD, Alzheimer's disease; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; Asc-1, sodium independent transporter system 1; ASCT1-2, sodium-dependent transporter system 1 or 2; ATF4, activating transcription factor 4; BBB, blood brain barrier (BBB); CBS, cystathione β-synthase; CNS, central nervous system; CREB1, cAMP responsive element binding protein 1; DAAO, D-amino acid oxidase; eIF2α, eukaryotic initiation factor 2; FAD, flavin adenine dinucleotide; GC–MS, gas chromatography coupled with mass spectrometry; GSH, thiol-reduced glutathione (γ-L-GLUTAMYL-L-cysteinyl-glycine); GSSG, disulfide-oxidized glutathione; H2S, hydrogen sulfide; HD, Huntington's disease; HDAC4, histone deacetylase 4; HEK293, human embryonic kidney 293 cells; KDMs, histone lysine demethylases; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; KMTs, histone lysine methyltransferases; LTP, long-term potentiation; mROS, mitochondrial reactive oxygen species; NDs, neurodegenerative diseases; NHP, non-human primate; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NLS, Neu–Laxova syndrome; NRF2, erythroid 2-related factor 2; oxPPP, pentose phosphate pathway; PD, Parkinson's disease; PEP, phosphoenolpyruvate; PHGDH, phosphoglycerate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; PKCζ, protein kinase C zeta; PP, phosphorylated pathway; PSAT1, phosphoserine aminotransferase 1; PSPH, phosphoserine phosphatase; SAM, S-adenosylmethionine; SAT1 to 3, sodium-dependent transporter system A 1 to 3; sgHMT, serine/glycine hydroxymethyltransferase; SLC, solute carrier; Sr, serine racemase; THF, tetrahydrofolate.

* Corresponding author at: Laboratoire des Maladies Neurodégénératives - UMR 9199, CEA CNRS, MIRCen, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.
E-mail address: gilles.bonvento@cea.fr (G. Bonvento)

[1] Equal contribution.

https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101896
Received 2 April 2020; Received in revised form 20 July 2020; Accepted 9 August 2020
Available online xxx
0301-0082/© 2020.

UNCORRECTED PROOF

In the brain, L-serine plays pivotal roles. Genetic conditions leading to a lack of L-serine production induce severe neurological abnormalities (see below section 6 on Serine deficiency), even if L-serine is produced by most dividing cells in the body. This is mainly the case because the role of L-serine in the central nervous system is not restricted to the synthesis of new cellular components during cell proliferation. For example, L-serine displays trophic effects on neurons in culture by increasing the length and the complexity of neurites (Mitoma et al., 1998; Savoca et al., 1995). More importantly, L-serine is critical for neurotransmission. L-serine is the precursor of two very important molecules that regulate the excitatory glutamatergic transmission. These two molecules, glycine and D-serine act as co-agonists of the N-methyl- D-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptor. While D-serine gates synaptic NMDARs and facilitates long-term potentiation (LTP, a persistent strengthening of synapses underlying synaptic plasticity), glycine acts mainly on extra-synaptic NMDARs, which are mostly involved in neurodegenerative disorders and cell death (Hardingham and Bading, 2010; Papouin et al., 2012). In addition, glycine acts as an inhibitory neurotransmitter via ionotropic glycine receptor transmission.

What is striking for brain L-serine, is the incapacity of neurons to produce it, at least after embryogenesis (Furuya and Watanabe, 2003). L-serine is a glia-specific amino acid the production and release of which are tightly regulated to fulfil the needs of neurons. Despite the potential importance of this amino acid for brain functioning, it is surprising how little we know about the mechanisms regulating L-serine production in the normal brain. We will, therefore, review available data concerning the biosynthesis of L-serine, the cellular localization and the regulation of the metabolic pathways leading to L-serine production in the brain. We will then summarize recent work that is beginning to unravel the roles of L-serine both in the healthy and diseased brain, data which suggests that that this amino acid is indeed indispensable to the central nervous system (CNS). We propose that, restoring astrocyte-mediated L-serine homeostasis may provide new therapeutic strategies for brain disorders.

2. Biosynthesis of L-SERINE

L-Serine can be taken up from the extracellular milieu or synthesized endogenously. Although L-serine is present in the blood, it diffuses poorly through the blood-brain barrier (BBB). As compared to essential amino acids that are efficiently transported from the blood to brain by the facilitative transport system L1 (Battistin et al., 1971; Hawkins et al., 2006), the blood-to-brain uptake of L-serine is about 5-7 times less effective (Oldendorf, 1971). Thus, *de novo* synthesis represents a substantial contribution to serine availability in the brain. We will summarize what we currently know about the metabolic pathways leading to L-serine production in the brain, their cellular localization and the mechanisms regulating the L-serine pool.

In 1965, Bridgers (Bridgers, 1965) was the first to demonstrate that L-serine can be produced via the phosphorylated pathway (PP) in the mammalian brain — as was originally described for bacteria in 1963. The PP starts from 3-phosphoglycerate (3PG), a glycolytic intermediate, and through the action of three enzymes, gives rise to L-serine (Fig. 1). The first reaction is catalyzed by phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), which oxidizes 3PG into 3-phosphohydroxypyruvate (3PHP) using NAD^+ as a co-factor. Then, 3PHP is transformed into 3-phosphoserine (3PS) by phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1) using L-glutamate as the amino group donor, which is converted into α-ketoglutarate (α-KG). The last step is catalyzed by phosphoserine phosphatase (PSPH) which hydrolyzes 3PS into L-serine and releases one inorganic phosphate. In the brain, the initial precursor 3PG probably comes from glucose (through glycolysis) and not from phosphoenolpyruvate (PEP) through gluconeogenesis. *Phgdh*-deficient mice have been produced using targeted gene disruption in embryonic

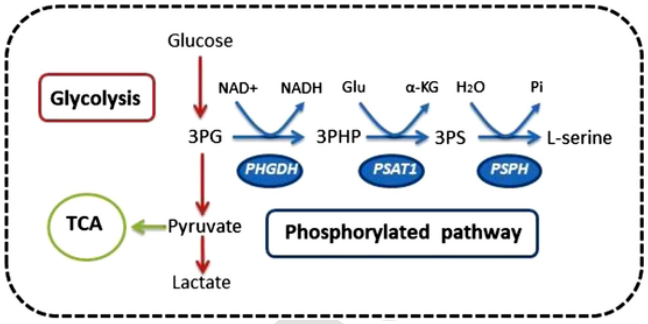


Fig. 1. The phosphorylated pathway of L-serine biosynthesis is a short metabolic sequence branching from glycolysis. The glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) is converted into 3-phosphohydroxypyruvate (3PHP), in a reaction catalyzed by 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) and using NAD + as a co-factor. 3PHP is metabolized into 3-phosphoserine (3PS) by phosphohydroxypyruvate aminotransferase (PSAT1) using L-glutamate (Glu) as the amino group donor, which is converted into α-ketoglutarate (α-KG). Finally, phosphoserine phosphatase (PSP) catalyzes the final and irreversible step of L-serine synthesis by hydrolyzing 3PS to produce L-serine and inorganic phosphate (Pi).

stem cells (Yoshida et al., 2004). *Phgdh*-null embryos have small bodies with abnormalities in particular in the CNS and die at E13.5. These results highlight the importance of L-serine production for proliferating cells (especially for normal brain development) but they also suggest that the majority of L-serine production is due to *de novo* synthesis from the glycolytic intermediate 3PG through the PP.

The PP is of great importance in the brain not only because it contributes to the vast majority of L-serine production but also because it uses and produces co-factors ($NADH/NAD^+$, glutamate and α-KG) that play key role in brain functioning. Supplementation of serine is often insufficient to rescue the defects in cellular fitness observed upon PHDGH inhibition (Possemato et al., 2011). The PP is a significant provider of α-KG at least in cancer cells with high levels of Phgdh expression, since approximately 50% of the conversion of glutamate into α-KG relies on PSAT1 activity (Possemato et al., 2011). PSAT1 activity also regulates α-KG production in mouse embryonic stem cells (Hwang et al., 2016). Considering the crucial role of glutamate, α-KG and $NADH/NAD^+$ ratio in the brain, it is important to take into account the activity of the enzymes of the PP as users/producers of these molecules.

Alternative pathways can also be implicated in the regeneration of L-serine. They include the conversion of glycine to L-serine and protein breakdown. The interconversion between L-serine and glycine is coupled to the folate cycle (Locasale, 2013) and is catalyzed by serine/glycine hydroxymethyltransferase (sgHMT). L-Serine conversion to glycine generates 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) from tetrahydrofolate (THF), making L-serine a one-carbon unit donor, an aspect that will be further discussed later. Finally, recycling of amino-acids may be especially important in the brain as the uptake of some amino acids by this tissue is restricted.

3. Cellular localization of the PP in the brain

The first evidence to suggest that L-serine synthesis is mostly performed in glial cells was established from studies which examined the cellular expression of *Phgdh* mRNA by *in situ* hybridization and of PHGDH protein by immunostaining (Furuya et al., 2000; Yamasaki et al., 2001). While Phgdh is strongly and homogeneously expressed among ventricular neuroepithelial stem cells at E13, its expression is lost during neuronal differentiation. Phgdh expression is then transmitted to the radial glia and later to astrocytes in both gray and white matter. In the adult rodent, PHGDH is found in astrocytes in many brain regions including the dentate gyrus, olfactory bulb, cerebellar Purkinje cell layer, corpus callosum, hippocampal fimbria and the anterior commissure. Further evidence suggests L-serine synthesis is

UNCORRECTED PROOF

mostly performed in glial cells not only in mice but also in non-human primates and humans. The brain RNA-seq database from Ben Barres Lab (Zhang et al., 2014) shows an enrichment of the transcripts of the three enzymes of the PP (PHGDH, PSAT1 and PSPH) in astrocytes and oligodendrocytes but not in neurons from P7-mouse cortex. Similar results were found in purified cells from the human temporal lobe cortex obtained after surgery for treating epilepsy and tumors (Zhang et al., 2016). Another recent database, obtained using single-cell transcriptional profiling of the adult mouse nervous system, makes it possible to identify which cell types express a combination of genes (Zeisel et al., 2018). Indeed, a combination of the three mRNAs was found in mature oligodendrocytes, fibrous astrocytes, satellite and enteric glial cells (proliferating cells). We recently conducted visible immunostaining on mouse, non-human primate (NHP) and human brain tissues as well as fluorescent co-labelling on mouse brain tissue. Visible PHGDH and PSAT1 staining showed mostly typical astrocytic-shaped cells in mouse, NHP and human hippocampus. Fluorescent co-labelling showed PHGDH co-localizes with GFAP in rodent brains. Noteworthy, the PHGDH antibody stands out as an excellent astrocyte marker in the brain; it is highly expressed in most astrocytes (which is not the case for GFAP) in the mouse brain and displays a prominent cytoplasmic staining (Fig. 2).

Astrocyte-specific deletion of Phgdh using a conditional Cre/Lox strategy in the brain of adult mice was shown to decrease the levels of L-serine by more than 80% (Le Douce et al., 2020; Yang et al., 2010). Levels of D-serine and glycine were also reduced in those animals; a finding which suggests that the astrocytic PP is crucial for L-, D-serine and glycine availability in the brain. Since the PP is branching from glycolysis, these latter results highlight a critical link between astrocyte glucose metabolism and L-serine availability (see below). The fact that L-serine biosynthesis is restricted to glial cells strongly suggests that specific transporters should be present to mediate shuttling of L-serine to neurons. The existence of such L-serine shuttle was first put forward by the group of Furuya (Furuya and Watanabe, 2003). The amino acid transporters (AATs) are part of the solute carrier (SLC) superfamily that comprises 65 families, 11 of which contain AATs (Kandasamy et al., 2018). Since the concentration of amino acids is usually higher inside than outside the cell, ion-coupled transporters, or amino acid exchangers, are required to transport amino acids inside cells. Serine, a small neutral amino acid is transported by three systems; the sodium-dependent transporter system ASC (alanine, serine, and cysteine preferring) which includes two members, ASCT1 and ASCT2; the sodium-dependent transporter system A (alanine-preferring) which includes three members, SAT1 to 3 and the sodium-independent transporter system Asc which includes Asc-1. ASCT1 is the main transporter for serine in astrocytes (Kaplan et al., 2018; Sakai et al., 2003), as also evidenced by the fact that deficiency of ASCT1 induces neurological manifestations in children that overlap with those observed in serine biosynthesis defects (El-Hattab, 2016), see Section 6 on serine deficiency below. The identity of the neural transporter remains to be clearly established, even if data suggests that ASCT2 can play an active role (Gliddon et al., 2009).su

4. Regulation of the activity of the PP

Since the PP is of paramount importance to generate *de novo* L-serine in the brain, we will discuss the different mechanisms that could affect the activity of the three enzymes of the PP. It is worthy to mention that the existence of most of these mechanisms in the brain has not yet been reported.

4.1. Structural modifications

At least three types of PHGDH structures have been described (Grant, 2018). Human PHGDH belongs to the type I, in which PHGDH proteins are composed of one substrate binding domain and one co-factor binding domain completed with two regulatory domains (ACT and ASB). PHGDH from *Mycobacterium tuberculosis* is the only type I enzyme for which a complete crystal structure has been solved (Dey

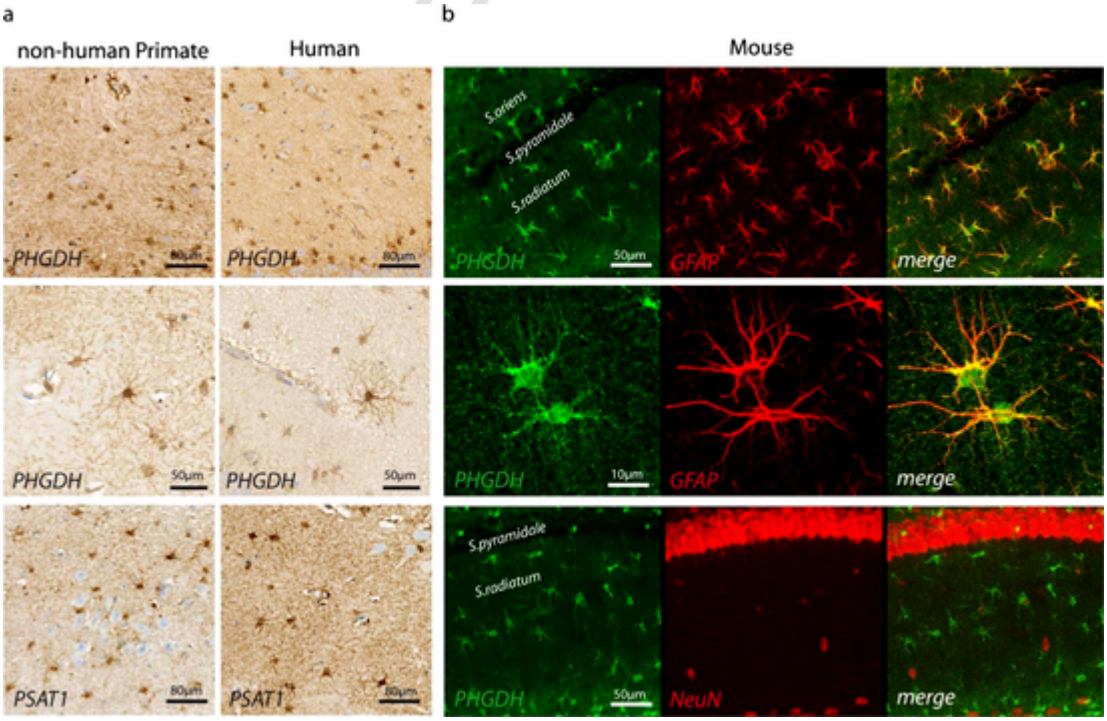


Fig. 2. (a) Immunostaining of PHGDH and of PSAT1 in the hippocampus of a non-human primate (*Macaca fascicularis*) and a human brain. Both enzymes of the phosphorylated pathway are mainly expressed in astrocytes. **(b)** Double immunofluorescent staining of dorsal hippocampus from 6-month old mice using PHGDH (green) and either astrocyte marker (GFAP, red) or a neuronal marker (NeuN, red) indicates that the biosynthesis of L-serine takes place mainly in adult astrocytes. Detailed methods about antibodies and fixation can be found in (Le Douce et al., 2020).

et al., 2005). Only a partial crystal structure of human PHGDH is available (Unterlass et al., 2017) and it revealed a tetramer structure with four similar active sites and a diverse organization of the regulatory domains (Unterlass et al., 2017). PSAT1 from *E. coli* and *A. thaliana* are the only PSAT1 proteins for which the structure has been determined (Hester et al., 1999; Sekula et al., 2018). The structure of the human form and its possible allosteric regulation remains unknown. The structure of crystal human PSPH has been determined in a complex with the substrate analog AP3. PSPH forms a dimer in physiological conditions. Each subunit is formed of a core domain and a dimerization domain and the active site is found in the cleft between these two domains (Kim et al., 2002).

Mutation, or phosphorylation, leading to an alteration of the 3D structure of PHGDH affects its activity. Indeed, SIV490M mutation, which causes one form of inherited Neu-Laxova disease (see Section 6 on Serine deficiency) (Klomp et al., 2000), impairs the folding and/or assembly of PHGDH (Pind et al., 2002). Phosphorylation at residues Ser55, Thr57, and Thr78, catalyzed by protein kinase C zeta (PKCζ), reduces PHGDH activity during glucose deprivation by changing PHGDH stability and ligand binding efficiency (Ma et al., 2013). PHGDH is a target for O-glycosylation (Maury et al., 2013) but the effect of such a modification on its structure remains unknown.

4.2. Competitive inhibition

PHGDH activity in mammals depends directly on the concentration of 3-PHP, which makes it very sensitive to competitive inhibition. No competitive effect has been observed with L-serine or any other amino acid that could have bound PHGDH at one of the active sites (Achouri et al., 1997). However, binding of ADP-Ribose on the cofactor binding site instead of NADH reduces PHGDH activity by ~50% (Unterlass et al., 2017).

4.3. Non-competitive inhibition

In bacteria and plants, it has been shown that L-serine can bind PHGDH on a regulation site and regulate L-serine synthesis through allosteric mechanisms (Grant, 2012). Even if the mammalian forms of PHGDH display the same regulation site, there is no allosteric regulation of PHGDH through L-serine binding on mammalian PHGDH (Achouri et al., 1997). This means that L-serine production is not regulated by a direct feedback loop on PHGDH. However, L-serine may be an uncompetitive inhibitor of human PSPH (Veeranna and Shetty, 1990).

4.4. Expression of enzymes of the PP is regulated by several transcription factors

The main transcription factor that regulates the expression of the enzymes of the PP is the activating transcription factor 4 (ATF4) (Harding et al., 2003). Its expression is increased when cells are deprived of amino acids or subjected to endoplasmic reticulum stress. ATF4 directly binds to promoters of L-serine biosynthetic genes to activate their transcription (DeNicola et al., 2015; Gao et al., 2017). Both translation and transcription of ATF4 can be regulated by other transcription factors such as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) (DeNicola et al., 2015), but also via histone methylations (Ding et al., 2013; Zhao et al., 2016) and by phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2α) (Ye et al., 2012). In the brain, little is known about these transcriptional regulatory mechanisms that have mostly been studied in cancer cells (Yang and Vousden, 2016) but a recent work suggests that ATF4 is also operating in brain cancers (Xia et al., 2019). It is worth-while to mention that ATF4 (Uhlén et al., 2015), NRF2 (Baxter and Hardingham, 2016) and cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1) (Uhlén et al., 2015) are highly expressed in glial cells. These regulatory pathways are crucial for synaptic activity (Habas et al., 2013; Oliva et al., 2013; Pasini et al., 2015) and neuron-glia metabolic interactions (Baxter and Hardingham, 2016; Jimenez-Blasco et al., 2015) which definitely makes them potential targets for regulating serine synthesis in astrocytes of the adult brain.

4.5. Regulation of PP by glycolysis and vice versa

The majority of L-serine production comes from *de novo* catabolism of the glycolytic intermediate 3PG. Using [U-^{13}C]-glucose, it was found that a substantial fraction of glycolytic carbon is indeed transferred to serine and that the two fluxes (glycolysis and PP) are comparable (Locasale et al., 2011). The fraction of 3PG diverted toward serine synthesis remains unknown in the brain and we are far from a full understanding of the co-ordination of glycolysis and serine biosynthetic pathways. Two important glycolytic enzymes (Phosphoglycerate kinase 1 and Phosphoglycerate mutase 1) maintains high levels of 3PG in cells, i.e. between 0.18 and 0.55 mM (Jin et al., 2020). A high cellular 3PG is critical for glycolysis to shuttle 3PG to the serine synthesis pathway because of the low affinity of PHGDH for its substrate. It follows that the glycolytic flux may control serine production in the brain. Since L-serine does not exert any direct feedback regulation on PHGDH, other mechanisms may exist to ensure a tight production of L-serine with respect to its cellular needs.

One mechanism has been suggested from the observation that L-serine can bind and activate the glycolytic enzyme pyruvate kinase (PK) (Ibsen and Marles, 1976). PK catalyzes the last step of glycolysis by converting PEP into pyruvate. Mammals express four PK isoforms, namely PKM1 (M1-PK, muscle isoform), PKM2 (embryonic and tumor isoform), PKL (liver isoform) and PKR (red blood cell isoform). While PKM1 is the constitutively active form present in many differentiated cells, PKM2 is mainly expressed in proliferating and cancer cells where it acts as a rheostat of glycolytic activity (Gui et al., 2013). It has been described in human colon carcinoma cells that L-serine specifically binds PKM2 and induces the formation of an active PKM2-tetramer (Chaneton et al., 2012). Therefore, when the level of L-serine is high, PKM2 is fully activated and the glycolytic flux is increased (Fig. 3). Conversely, when the level of serine is low, glycolytic efflux to lactate is transiently reduced, leading to the significant accumulation the glycolytic intermediates 3PG (by a factor of 2) that can be re-routed toward L-serine production (Ye et al., 2012) or 2-phosphoglycerate (2PG) that directly increases PHGDH activity (Hitosugi et al., 2012). Another indirect mechanism by which PKM2 could control serine production is via MDM2 chromatin binding, which was recently shown to increase the expression of *Phgdh*, *Psat1* and *Psph* (Riscal et al., 2016). Several reports also demonstrated that some factors regulating PKM2 do alter serine production (Abeywardana et al., 2018; Anastasiou et al., 2012). In concord, these results show that the flux of the PP controls glycolysis by modulating PKM2 activity that, in turn, controls serine production through substrate availability.

Conversely, there is evidence that experimental conditions which alter the L-serine flux also affect glucose metabolism. Thus, genetic silencing of *Phgdh* leads to the alteration of the levels of many glycolytic intermediates (Locasale et al., 2011). In addition, ablation of PHGDH or PSPH increases lactate production, suggesting an increase of aerobic glycolysis as predicted by computational modelling (Yizhak et al., 2014). During serine starvation, cells are unable to regulate their glycolytic flux, a finding that also suggests a direct link between glycolysis and serine production (Gravel et al., 2014; Maddocks et al., 2012). Finally, pharmacological inhibition of PHGDH alters the pentose phos-

UNCORRECTED PROOF

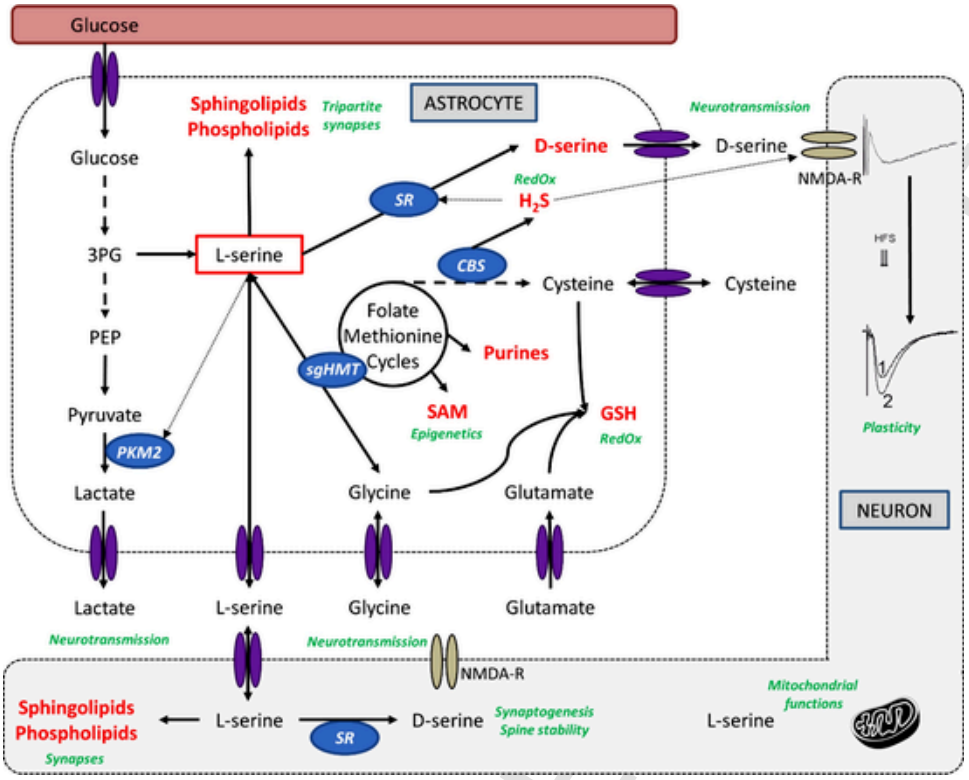


Fig. 3. In the brain, astrocytic L-serine plays pivotal roles (all indicated in green). L-Serine is critical for neurotransmission and synaptic plasticity. It is the main precursor of glycine and D-serine, two co-agonists of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of the glutamate receptor. These receptors are required for long-term potentiation of post-synaptic responses during high frequency stimulation (HFS). By regulating the glycolytic flux via its binding on PKM2, L-serine can also alter the production of lactate, a positive modulator of NMDAR-mediated signaling. Via its link to one-carbon metabolism, L-serine contributes to the regulation of the redox status (via synthesis of glutathione (GSH), epigenetics (through synthesis of S-adenosylmethionine, SAM), generation of nucleotide pools (purines) and production of hydrogen sulfide, a gasotransmitter that can directly affect NMDA activity). L-Serine may also significantly contribute to the homeostasis of synapses and of mitochondrial function by providing sphingolipids, phospholipids and ceramide. Lactate can be used as an energy substrate for neurons but it also provides signals that modulate neuronal functions, including excitability, plasticity and memory consolidation (Magistretti and Allaman, 2018).Abbreviations: 3PG, 3-phosphoglycerate ; SR, serine racemase ; CBS, cystathione β-synthase; PKM2, pyruvate kinase isoform 2; sgHMT, serine/glycine hydroxymethyltransferase; H_2S, hydrogen sulfide ; GSH, glutathione ; HFS, high frequency stimulation, SAM, S-adenosylmethionine

phate pathway (oxPPP) and the tricarboxylic acid cycle (Reid et al., 2018).

How can we integrate this information in the context of the brain? Astrocytes share many metabolic similarities with cancer cells (Belanger et al., 2011). A recent study demonstrated that astrocytes express PKM2 instead of the usual expression of PKM1 in differentiated cells (Zhang et al., 2016). These observations suggest that the regulatory loop between glycolytic activity and serine production through PKM2 activity could occur in astrocytes and not in neurons. By activating PKM2, serine supports aerobic glycolysis and lactate production, a cardinal feature of astrocytes (Bolanos, 2016). Moreover, in astrocytes, mitochondrial complex I is loosely assembled into supercomplexes, which explains the high generation of mitochondrial reactive oxygen species (mROS) by these cells (Lopez-Fabuel et al., 2016). Recently, such a naturally-occurring high mROS production by astrocytes was unveiled to up-regulate glycolysis *via* a redox mechanism involving histone deacetylase 4 (HDAC4)-mediated control of the oxPPP (Vicente-Gutierrez et al., 2019).

5. What is the role of L-serine in the brain?

5.1. Providing D-serine

In the early 1990's, a group in Japan used gas chromatography (GC) and GC with mass spectrometry (GC–MS) to show that free D-serine is present and enriched in the brain at a high concentration (0.27 μmol/g, *i.e.*, ~25% of the level of L-serine) (Hashimoto et al., 1992). The detection of D-serine in mice bred in germ-free conditions (Nagata et al., 1994) confirmed that D-amino-acids are not only produced in bacteria. Radiolabeled molecules of glucose, L-serine and glycine were used to investigate the origin of this endogenous mammalian D-serine (Dunlop and Neidle, 1997) and it was found that L-serine is the direct precursor of D-serine. The conversion of L- INTO D-serine is catalyzed by serine racemase (Sr), a pyridoxal 5'-phosphate dependent enzyme that was purified in 1999 from glial cultures of rat cerebral cortex (Wolosker et al., 1999). Transfection of Sr in human embryonic kidney 293 cells (HEK293) promotes D-SERINE PRODUCTION AND DECREASES L-serine content, validating Sr function *in vitro* (de Miranda et al., 2002). Mice with a targeted deletion of Sr display a large decrease of D-serine levels in the brain (80–90%), thereby confirming the function of Sr *in vivo* (Basu et al., 2009; Horio et al., 2011). It is now commonly accepted that Sr is the main enzyme that catalyzes the racemization of L-SERINE TO D-serine but debates are still raging to determine (1) in which cell type this racemization takes place and (2) which cell type is releasing it for neurotransmission (Papouin et al., 2017b; Wolosker et al., 2017). The aforementioned authors all agree with the astrocytic production of L-serine, however, some claim it is racemized into D-serine and released by astrocytes as a gliotransmitter whereas others claim L-serine is shuttled to neurons where it is racemized and thereafter released. In addition to ASCT1, asc-1 has been more recently reported to be expressed by neurons and to play a significant role in regulating extracellular concentration of D-serine in the brain (Maucler et al., 2013; Rosenberg et al., 2013; Sason et al., 2017). Therefore, the existence of a serine shuttle between astrocytes and neurons for synthesis, release and degradation is likely but its regulation still needs to be fully characterized (Fig. 3).

UNCORRECTED PROOF

The critical role that D-serine plays in the brain has been extensively reviewed (Martineau et al., 2006; Wolosker and Radzishevsky, 2013) and D-serine is now recognized as the main endogenous ligand of the strychnine insensitive glycine-binding site of synaptic NMDA receptors in the hippocampus (Fig. 3) (Mothet et al., 2000; Papouin et al., 2012). The co-agonist binding site of NMDA-R is not saturated *in vivo* (Berger et al., 1998) and minor alterations of D-serine concentration at the synapse can, therefore, dynamically modulate NMDA-R responses (Papouin et al., 2017a). D-serine regulates many functions of these receptors including synaptic transmission and plasticity (Henneberger et al., 2010; Panatier et al., 2006). Accordingly, genetically modified mice lacking the ability to produce D-serine endogenously, display altered glutamatergic neurotransmission and impaired spatial memory (Basu et al., 2009; Labrie et al., 2009). Conversely, mice deficient for DAAO (D-amino acid oxidase, the flavoenzyme that selectively degrades D-serine) show facilitation in LTP induction and an increase in memory abilities (Maekawa et al., 2005; Pritchett et al., 2015). However, a causal link between elevated D-serine and the behavioral phenotypes of those transgenic mice lacking functional DAAO remains to be determined. In addition, it is possible that the altered behavior of DAAO −/− mice may be a consequence of heightened anxiety (Pritchett et al., 2016). Recent experiments performed *in vitro* and in hippocampal or cortical slices suggest that the activation of NMDA-Rs by D-serine and glycine may be regulated by the PP (Neame et al., 2019).

The role of D-serine is not limited to synaptic plasticity (Fuchs et al., 2011), as it is well recognized that NMDA-Rs play very important roles in the physiological and pathological processes in the brain. For example, D-serine binding on NMDA-Rs affects neuronal proliferation in the dentate gyrus (Zhao et al., 2018), neuronal migration during cerebellum development (Kim et al., 2005), synaptogenesis (Diniz et al., 2012), dendritic morphology (Balu et al., 2012; Sultan et al., 2015), spine density (DeVito et al., 2011; Sultan et al., 2015), spine stability and synapse integration (Lin et al., 2016; Sultan et al., 2015).

From the foregoing, it is clear that, the concentration of D-serine needs to be tightly regulated. Degradation of D-serine is performed by DAAO (Pollegioni and Sacchi, 2010). Its expression in the brain is highly heterogeneous, being most abundant in the cerebellum and the brainstem with respect to the forebrain. Serine racemase can also catalyze α,β-elimination of water from L- OR D-serine (Foltyn et al., 2005). The elimination was shown to compete with the isomerization for regulating intracellular D-serine levels, especially in forebrain areas that have low DAAO activity (Foltyn et al., 2005). It is worth mentioning that α,β-elimination of water from L- OR D-serine yields pyruvate, a major substrate for oxidative metabolism. Whether this pathway may serve to fuel mitochondria in neurons for ATP production or, may participate in the production of lactate in astrocytes for signaling purposes, needs to be further tested.

5.2. L-Serine and lipids

Lipids are the most abundant organic compounds found in the brain, accounting for up to 50% of its dry weight with a specific enrichment in sphingolipids and cholesterol, particularly in the form of myelin. Interestingly, L-serine is the head group of the phospholipid phosphatidylserine and a mandatory substrate for ceramide synthesis, the common backbone of sphingolipids. However, whether and how these components of L-serine metabolism participate in cellular physiology is not well understood (Hirabayashi and Furuya, 2008). A recent study has provided evidence for a novel role of L-serine in the support of mitochondrial function, morphology and membrane potential through ceramide metabolism (Gao et al., 2018). During development, astrocytes promote the formation of synapses in distinct neuronal populations via the release of many molecules including membrane lipids such as cholesterol (Mauch et al., 2001). Moreover, sphingolipids are enriched in lipid rafts; membrane micro-domains that contribute to a wide variety of biological functions including protein trafficking/exocytosis, membrane transport, cell adhesion, and cell survival.

Besides development and cell proliferation, whether L-serine-derived lipids are involved in the dynamic processes underlying dendritic growth and spines formation (Kasai et al., 2010) deserves further investigation (Fig. 3).

5.3. L-Serine and reactive oxygen species (ROS)

Reactive oxygen species (ROS) are an intricate part of normal cellular physiology but when produced in excess, ROS lead to widespread oxidative damage of lipids, protein and nucleic acid and ultimately to cell death (Mullarky and Cantley, 2015). L-serine may play an important role in the antioxidant defense system because it provides carbons for the synthesis of glutathione (GSH) through the production of glycine. GSH is a tripeptide (γ-L-GLUTAMYL-L-cysteinyl-glycine) the biosynthesis of which requires L-serine as the precursor of glycine and cysteine (Fig. 3). Glutathione exists as thiol-reduced (GSH, predominant) and disulfide-oxidized (GSSG) forms. GSSG is reduced by glutathione reductase, which uses NADPH as a co-factor to regenerate the pool of GSH and hence to restore the reducing power of cells (Lu, 2009). The most direct route to produce NADPH in the cytosol is the oxidative branch of the oxPPP. However, as recently observed (Fan et al., 2014), the folate cycle fueled by L-serine is another significant provider of NADPH and may therefore represent an alternative source of NADPH to reduce GSSG in astrocytes. The conversion of serine to glycine could have the combined advantage of providing GSH synthesis and the NADPH-reducing power to maintain GSH in its reduced form.

Recent findings indicate serine biosynthesis is critically involved in the defense mechanisms against oxidative stress in the retina (Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2019). The authors found that Müller cells (the major glial cells of retina) from the macula express more PHGDH, display greater glycolytic and *de novo* serine synthesis rates as well as increased levels of reduced GSH and ROS compared to those present in the peripheral retina. Accordingly, macular Müller cells were more susceptible to oxidative stress after inhibition of PHGDH. These results suggest that dysregulation of serine biosynthesis may be a potential cause of the high susceptibility of the human macula to develop blindness.

ROS can also directly influence serine production. In cancer cells, elevated levels of ROS inhibit Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) which in turn activates NRF2 and promote the expression of almost 200 genes involved in the antioxidant responses, including the 3 genes of the PP (DeNicola et al., 2015; Mullarky and Cantley, 2015).

5.4. L-Serine and folate, methionine and H_2S

Conversion of L-serine to glycine by sgHMT feeds folate and methionine cycles, two metabolic pathways that are tightly imbricated in what is called one-carbon metabolism (Fig. 3) (Ducker and Rabinowitz, 2017; Locasale, 2013). This complex metabolic process transfers one-carbon units for biosynthetic processes including purine and thymidine synthesis and homocysteine remethylation. It is therefore critical for cellular proliferation and potentially also for epigenetics. Homocysteine concentrations are regulated by the activity of another pathway, the trans-sulfuration pathway, along which the homocysteine sulfur atom is transferred to serine to make cysteine due to the action of cystathione β-synthase (CBS). In the brain, the trans-sulfuration pathway is required to support glutathione synthesis (Vitvitsky et al., 2006)

UNCORRECTED PROOF

and may contribute to cellular redox homeostasis. CBS can also perform desulfhydratation of cysteine and/or homocysteine, which leads to the production of hydrogen sulfide (H_2S). Three different pathways can produce H_2S, however, among the enzymes involved in H_2S synthesis, CBS is the only one found at high levels in the brain (Abe and Kimura, 1996). Therefore, the hypothesis that L-serine metabolism may be linked with H_2S synthesis through CBS activity deserves attention. In the brain, H_2S has been described as a gaso-transmitter that can participate in synaptic transmission via multiple pathways. H_2S can alter glutamatergic transmission via sulfhydration of NR2A-containing NMDARs (Fig. 3), a post-translational modification that prevents the inhibitory action of synaptically released Zn^{2+} (Luo et al., 2018). It can also promote surface expression of the α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA)-R subunit GluR1/GluA1 involved in the regulation of synaptic plasticity (Li et al., 2016) and finally, it has been shown to facilitate LTP via sulfhydration of Sr, a modification that increases its activity (Fig. 3) (Li et al., 2017). H_2S may also indirectly increase the serine biosynthesis via the sulfhydration of Keap1, a modification that will increase the nuclear translocation of NRF2 and therefore the transcription of its target genes, including the 3 genes of the PP (see above).

In the brain, CBS is mainly, if not only, located in astrocytes (Paul and Snyder, 2018), which makes astrocytes the major site of free H_2S production. H_2S can be stored in three different ways in brain cells: acid-labile sulfurs are found in mitochondria and release H_2S under acidic conditions; bound sulfurs are found in the cytoplasm and release H_2S under alkaline conditions and finally; free H_2S is thought to exist in the cytoplasm but at concentrations so low (<10 μM) that it cannot be easily measured (Ishigami et al., 2009).

H_2S used for synaptic transmission is likely to be released by astrocytes from bound sulfurs only during alkaline conditions, that is when these glial cells take up K^+ that are released by nearby active neurons (Ishigami et al., 2009). Neuronal K^+ can also exert a strong stimulatory effect on astrocytic glycolysis (Bittner et al., 2011), therefore suggesting an integrated and co-ordinated response of astrocytes during neuronal activity (Jimenez-Blasco et al., 2015) with respect to ROS maintenance, serine production and glycolytic flux.

5.5. Epigenetic regulation

As mentioned above, serine metabolism is influenced by epigenetic modifiers such as histone lysine methyltransferases (KMTs) and demethylases (KDMs) that play a key role in regulating transcription by controlling the state of histone lysine methylation. KMTs use S-adenosylmethionine (SAM) as the methyl group donor while KDMs need flavin adenine dinucleotide (FAD) and α-KG for demethylation, which strongly suggests that their activities are sensitive to changes in cell metabolism (Zhao et al., 2016). Therefore, metabolism can also influence epigenetics by regulating the availability of co-factors required for key epigenetic enzymes (Li et al., 2018). This is true for L-serine metabolism since it is linked to one-carbon metabolism (Fig. 3), providing methionine as a precursor for SAM — the major methyl donor regulating methylation status of nucleic acids and histone proteins (Kim and Park, 2018). Using stable isotope tracing, mass spectrometry and nutrient modulation in cancer cells, the role of L-serine in supporting methylation through maintenance of nucleotide levels has been recently highlighted (Maddocks et al., 2016). This crosstalk between cellular metabolism and the epigenome probably represents a key regulatory pathway that one needs to study further. No information is yet available on the interplay between L-serine metabolism and epigenetics in the brain, despite increasing evidence that, (1) epigenetic mechanisms are critical for the maintenance of a healthy brain and are dysregulated in the course of many neurodegenerative diseases (Berson et al., 2018) and (2) peripheral metabolism can impact brain histone acetylation and behavior (Mews et al., 2019).

6. Serine deficiency

6.1. Genetic defects

Very interesting lessons regarding L-serine biosynthesis in the CNS can be drawn from clinical observations. Serine synthesis disorders were first reported by Jaeken and colleagues in 1996 (Jaeken et al., 1996a; Jaeken et al., 1996b) in patients with neurological symptoms in which amino acid analysis revealed low values of serine in plasma and CSF. They found that the symptoms were caused by mutations in either PHGDH or PSPH. These patients displayed severe neurological impairments including congenital microcephaly, psychomotor retardation and seizures, which suggests an important role for PHGDH activity and L-serine biosynthesis in the metabolism, development and function of the CNS. In 2014, more than 40 years after its initial description by Neu and Laxova (Laxova et al., 1972; Neu and Kajii, 1971), Neu–Laxova syndrome (NLS [MIM 256520]) was found to represent the severe end of serine biosynthesis defects (Shaheen et al., 2014). NLS is genetically heterogeneous because it can be caused by mutations in each of the three enzymes of the L-serine biosynthesis pathway (PHGDH, PSAT1 and PSPH) (Acuna-Hidalgo et al., 2014). The clinical hallmarks of this rare syndrome are a characteristic facies, microcephaly, seizures, intra-uterine growth restriction and skin abnormalities. A serine transport defect resulting from mutations of ASCT1 (the main transporter for serine in the CNS) has been recently described in children with neurological manifestations similar to those observed in NLS (Damseh et al., 2015). The phenotype caused by all these genetic defects strongly suggests that the PP is the major route for serine production in the CNS.

Other pertinent information concerns the use of L-serine as a potential therapeutic agent. Since serine deficiency is the main etiological factor in serine biosynthesis defects, chronic treatment with serine has already been performed in children suffering from the infantile serine deficiency phenotype (De Koning et al., 2002). L-serine therapy (recommended dose of L-SERINE IS 500–700 mg/kg/day) has proven to be beneficial in preventing or ameliorating symptoms in serine biosynthesis and transport defects if started before neurological damages occur (El-Hattab, 2016). In one patient with a prenatal diagnosis of L-SERINE DEFICIENCY, L-serine treatment was administered to the mother starting from week 27 and was continued after birth (de Koning et al., 2004). It completely prevented the onset of neurological symptoms for more than 10 years. When given too late, L-serine failed to substantially rescue neurocognitive impairments (Brassier et al., 2016). This negative result regarding serine supplementation may be due to the fact that, *in utero* serine deficiency has already resulted in neurological damage that cannot be reversed by postnatal supplementation. Contrarily to D-serine, that may induce nephrotoxicity (Ganote et al., 1974), there is no toxicity associated with chronic L-serine treatment since some patients with PHGDH deficiency have taken their daily amino acid supplements for more than a decade without any side-effects. These data support the contention that L-serine production is critical for CNS development and function and that its dietary supplementation can partially restore well-being and behavior of patients.

6.2. Alteration of L-serine biosynthesis in neurodegenerative diseases?

One important process that becomes dysfunctional early in the course of many neurodegenerative diseases (NDs) such as Alzheimer's (AD), Parkinson's (PD) and Huntington's disease (HD) is the metabolism of glucose (Bonvento et al., 2017). Reduced glucose consumption has been widely reported in the caudate/putamen of HD patients (Kuhl et al., 1984) and in specific cortical areas in AD pa-

UNCORRECTED PROOF

tients (Mosconi et al., 2006). Most of these diseases are associated with impaired mitochondrial function leading to a disruption of ATP production (Lin and Beal, 2006). As such, it is commonly admitted that the loss of ATP bioavailability is instrumental in precipitating dysfunction and neurodegeneration in NDs (Butterfield and Halliwell, 2019). However, more recent data support the idea that a selective defect of glycolysis occurs early in the course of the disease, as shown in HD (Powers et al., 2007) and AD patients (An et al., 2018; Vlassenko and Raichle, 2015). Since glycolysis is a source of carbon for L-serine, a major reduction of the glycolytic flux is likely to alter its synthesis. However, old as well as more recent, biochemical analyzes have not produced conclusive results on the evolution of L/D-serine levels in the brain of AD patients (Biemans et al., 2016; Chouinard et al., 1993; Fisher et al., 1998; Madeira et al., 2015; Nagata et al., 1995). Possible explanations for these inconclusive results include analytical methods, the fact that AD patients were not at the same stage of the disease progression, the very low number of samples studied and the fact that CSF samples were obtained by lumbar puncture (far from the affected regions) or even during autopsies following opening of the cranial cavity. Additional studies are required to obtain a clearer picture of the time-course of both L- AND D-serine levels in the brain of AD patients. This is important because any significant alteration of the biosynthesis of L-serine may potentially contribute to the pathogenesis of NDs. We recently found that the extracellular levels of both L- AND D-serine were reduced in the hippocampus of 3xTg-AD, a mouse model of AD that displays lower glycolytic flux in hippocampal astrocytes (Le Douce et al., 2020). Such impairment of glycolysis-derived L-serine production in astrocytes contributes to early synaptic and behavioral deficits since a chronic supplementation of L-serine given as a nutrient was able to restore those deficits (Le Douce et al., 2020). Such a supplementation with L-serine was recently shown to ameliorate motor and cognitive performance in a rare NMDA-related severe encephalopathy leading to glutamatergic signaling deficiency (Soto et al., 2019). Besides AD, L-serine is currently in a phase I clinical trial as a treatment for hereditary sensory autonomic neuropathy type 1 (Garofalo et al., 2011) and amyotrophic lateral sclerosis (Levine et al., 2017). Taken together, these data show the need to better understand how L-serine production is regulated in the brain in order to define whether and how L-serine can be considered as a ready-to-use therapeutic option for treating potentially numerous brain diseases as well as normal aging, a condition in which NMDA/D-serine activity is also known to be impaired (Billard, 2013).

Declaration of Competing Interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Alan R. Young for critical reading and editing of the manuscript. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011 MALZ-0003 to GB), Association France Alzheimer and Fondation de France (Prix Spécial 2012 to GB), Fondation Plan Alzheimer (GB), Infrastructure de Recherche translationnelle pour les Biothérapies en Neurosciences-NeurATRIS ANR-11-INBS-0011 (GB). PAV is a recipient of a PhD fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number ECO20170637547). Juan P. Bolanos is funded by MINECO (SAF2016-78114-R), Instituto de Salud Carlos III (RD12/0043/0021), Junta de Castilla y León (Escalera de Excelencia CLU-2017-03), Ayudas Equipos Investigación Biomedicina 2017 Fundación BBVA, and Fundación Ramón Areces.

Appendix A. The Peer Review Overview and Supplementary data

The Peer Review Overview and Supplementary data associated with this article can be found in the online version: https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101787.

References

Abe, K, Kimura, H, 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J. Neurosci. 16, 1066–1071.
Abeywardana, T, Oh, M, Jiang, L, Yang, Y, Kong, M, Song, J, Yang, Y, 2018. CARM1 suppresses de novo serine synthesis by promoting PKM2 activity. J. Biol. Chem. 293, 15290–15303.
Achouri, Y, Rider, M H, Van Schaftingen, E, Robbi, M, 1997. Cloning, sequencing and expression of rat liver 3-phosphoglycerate dehydrogenase. Biochem. J. 323, 365–370.
Acuna-Hidalgo, R, Schanze, D, Kariminejad, A, Nordgren, A, Kariminejad, M H, Conner, P, Grigelioniene, G, Nilsson, D, Nordenskjold, 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, M G, Boycott, K M, Gilissen, C, Janecke, A R, Hoischen, A, Zenker, M, 2014. Neu-laxova syndrome is a heterogeneous metabolic disorder caused by defects in enzymes of the l-serine biosynthesis pathway. Am. J. Hum. Genet. 95, 285–293.
An, Y, Varma, V R, Varma, S, Casanova, R, Dammer, E, Pletnikova, O, Chia, C W, Egan, J M, Ferrucci, L, Troncoso, J, Levey, A I, Lah, J, Seyfried, N T, Legido-Quigley, C, O'Brien, R, Thambisetty, M, 2018. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. Alzheimers Dementia 14, 318–329.
Anastasiou, D, Yu, Y, Israelsen, W J, Jiang, J K, Boxer, M B, Hong, B S, Tempel, W, Dimov, S, Shen, M, Jha, A, Yang, H, Mattaini, K R, Metallo, C M, Fiske, B P, Courtney, K D, Malstrom, S, Khan, T M, Kung, C, Skoumbourdis, A P, Veith, H, Southall, N, Walsh, M J, Brimacombe, K R, Leister, W, Lunt, S Y, Johnson, Z R, Yen, K E, Kunii, K, Davidson, S M, Christofk, H R, Austin, C P, Inglese, J, Harris, M H, Asara, J M, Stephanopoulos, G, Salituro, F G, Jin, S, Dang, L, Auld, D S, Park, H W, Cantley, L C, Thomas, C J, Vander Heiden, M G, 2012. Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. Nat. Chem. Biol. 8, 839–847.
Balu, D T, Basu, A C, Corradi, J P, Cacace, A M, Coyle, J T, 2012. The NMDA receptor co-agonists, D-serine and glycine, regulate neuronal dendritic architecture in the somatosensory cortex. Neurobiol. Dis. 45, 671–682.
Basu, A C, Tsai, G E, Ma, C L, Ehmsen, J T, Mustafa, A K, Han, L, Jiang, Z I, Benneyworth, M A, Froimowitz, M P, Lange, N, Snyder, S H, Bergeron, R, Coyle, J T, 2009. Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. Mol. Psychiatry 14, 719–727.
Battistin, L, Grynbaum, A, Lajtha, A, 1971. Uptake of Various Amino Acids by Mouse Brain in-Vivo. Brain Res. 29 85-+.
Baxter, P S, Hardingham, G E, 2016. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. Free Radi. Biol. Med. 100, 147–152.
Belanger, M, Allaman, I, Magistretti, P J, 2011. brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. Cell Metab. 14, 724–738.
Berger, A J, Dieudonne, S, Ascher, P, 1998. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. J. Neurophysiol. 80, 3336–3340.
Berson, A, Nativio, R, Berger, S L, Bonini, N M, 2018. Epigenetic regulation in neurodegenerative diseases. Trends Neurosci. 41, 587–598.
Biemans, E A, Verhoeven-Duif, N M, Gerrits, J, Claassen, J A, Kuiperij, H B, Verbeek, M M, 2016. CSF d-serine concentrations are similar in Alzheimer's disease, other dementias, and elderly controls. Neurobiol. Aging 42, 213–216.
Billard, J M, 2013. Serine racemase as a prime target for age-related memory deficits. Eur. J. Neurosci. 37, 1931–1938.
Bittner, C X, Valdebenito, R, Ruminot, I, Loaiza, A, Larenas, V, Sotelo-Hitschfeld, T, Moldenhauer, H, San Martin, A, Gutierrez, R, Zambrano, M, Barros, L F, 2011. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K+ and a delayed and persistent effect of glutamate. J. Neurosci. 31, 4709–4713.
Bolanos, J P, 2016. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. J Neurochem..
Bonvento, G, Valette, J, Flament, J, Mochel, F, Brouillet, E, 2017. Imaging and spectroscopic approaches to probe brain energy metabolism dysregulation in neurodegenerative diseases. J. Cereb. Blood Flow Metab. 37, 1927–1943.
Brassier, A, Valayannopoulos, V, Bahi-Buisson, N, Wiame, E, Hubert, L, Boddaert, N, Kaminska, A, Habarou, F, Desguerre, I, Van Schaftingen, E, Ottolenghi, C, de Lonlay, P, 2016. Two new cases of serine deficiency disorders treated with L-serine. Eur. J. Paediatr. Neuro. 20, 53–60.
Bridgers, W F, 1965. Biosynthesis of serine in mouse brain extracts. J. Biol. Chem. 240 4591-&.
Butterfield, D A, Halliwell, B, 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurosci. 20, 148–160.
Chaneton, B, Hillmann, P, Zheng, L, Martin, A C, Maddocks, O D, Chokkathukalam, A, Coyle, J E, Jankevics, A, Holding, F P, Vousden, K H, Frezza, C, O'Reilly, M, Gottlieb, E, 2012. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. Nature 491, 458–462.
Chouinard, M L, Gaitan, D, Wood, P L, 1993. Presence of the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor agonist, D-Serine, in human temporal cortex - comparison of normal, Parkinson, and Alzheimer tissues. J. Neurochem. 61, 1561–1564.

UNCORRECTED PROOF

Damseh, N, Simonin, A, Jalas, C, Picoraro, J A, Shaag, A, Cho, M T, Yaacov, B, Neidich, J, Al-Ashhab, M, Juusola, J, Bale, S, Telegrafi, A, Retterer, K, Pappas, J G, Moran, E, Cappell, J, Anyane Yeboa, K, Abu-Libdeh, B, Hediger, M A, Chung, W K, Elpeleg, O, Edvardson, S, 2015. Mutations in SLC1A4, encoding the brain serine transporter, are associated with developmental delay, microcephaly and hypomyelination. J. Med. Genet. 52, 541–547.

De Koning, T J, Duran, M, Van Maldergem, L, Pineda, M, Dorland, L, Gooskens, R, Jaeken, J, Poll-The, B T, 2002. Congenital microcephaly and seizures due to 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: Outcome of treatment with amino acids. J. Inherited Metab. Dis. 25, 119–125.

de Koning, T J, Klomp, L W, van Oppen, A C, Beemer, F A, Dorland, L, van den Berg, I, Berger, R, 2004. Prenatal and early postnatal treatment in 3-phosphoglycerate-dehydrogenase deficiency. Lancet 364, 2221–2222.

De Koning, T J, Snell, K, Duran, M, Berger, R, Poll-The, B T, Surtees, R, 2003. L-serine in disease and development. Biochem. J. 371, 653–661.

de Miranda, J, Panizzutti, R, Foltyn, V N, Wolosker, H, 2002. Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99, 14542–14547.

DeNicola, G M, Chen, P H, Mullarky, E, Sudderth, J A, Hu, Z, Wu, D, Tang, H, Xie, Y, Asara, J M, Huffman, K E, Wistuba, I I, Minna, J D, DeBerardinis, R J, Cantley, L C, 2015. NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. Nat. Genet..

DeVito, L M, Balu, D T, Kanter, B R, Lykken, C, Basu, A C, Coyle, J T, Eichenbaum, H, 2011. Serine racemase deletion disrupts memory for order and alters cortical dendritic morphology. Genes Brain Behav. 10, 210–222.

Dey, S, Grant, G A, Sacchettini, J C, 2005. Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 280, 14892–14899.

Ding, J, Li, T, Wang, X W, Zhao, E H, Choi, J H, Yang, L Q, Zha, Y H, Dong, Z, Huang, S, Asara, J M, Cui, H J, Ding, H F, 2013. The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation. Cell Metab. 18, 896–907.

Diniz, L P, Almeida, J C, Tortelli, V, Lopes, C V, Setti-Perdigao, P, Stipursky, J, Kahn, S A, Romao, L F, de Miranda, J, Alves-Leon, S V, de Souza, J M, Castro, N G, Panizzutti, R, Gomes, F C A, 2012. Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. J. Biol. Chem. 287, 41432–41445.

Ducker, G S, Rabinowitz, J D, 2017. One-carbon metabolism in health and disease. Cell Metab. 25, 27–42.

Dunlop, D S, Neidle, A, 1997. The origin and turnover of D-serine in brain. Biochem. Biophy. Res. Co 235, 26–30.

Eagle, H, 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130, 432–437.

El-Hattab, A W, 2016. Serine biosynthesis and transport defects. Mol. Genet. Metab. 118, 153–159.

Fan, J, Ye, J B, Kamphorst, J J, Shlomi, T, Thompson, C B, Rabinowitz, J D, 2014. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. Nature 510 298-+.

Fisher, G, Lorenzo, N, Abe, H, Fujita, E, Frey, W H, Emory, C, Di Fiore, M M, D'Aniello, A, 1998. Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. Amino Acids 15, 263–269.

Foltyn, V N, Bendikov, I, De Miranda, J, Panizzutti, R, Dumin, E, Shleper, M, Li, P, Toney, M D, Kartvelishvily, E, Wolosker, H, 2005. Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an alpha,beta-elimination activity. J. Biol. Chem. 280, 1754–1763.

Fuchs, S A, Berger, R, de Koning, T J, 2011. D-Serine: The right or wrong isoform? Brain Res. 1401, 104–117.

Furuya, S, Tabata, T, Mitoma, J, Yamada, K, Yamasaki, M, Makino, A, Yamamoto, T, Watanabe, M, Kano, M, Hirabayashi, Y, 2000. L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 11528–11533.

Furuya, S, Watanabe, M, 2003. Novel neuroglial and glioglial relationships mediated by L-serine metabolism. Arch. Histol. Cytol. 66, 109–121.

Ganote, C E, Peterson, D R, Carone, F A, 1974. The nature of D-serine--induced nephrotoxicity. Am. J. Pathol. 77, 269–282.

Gao, S, Ge, A, Xu, S, You, Z, Ning, S, Zhao, Y, Pang, D, 2017. PSAT1 is regulated by ATF4 and enhances cell proliferation via the GSK3β/β-catenin/cyclin D1 signaling pathway in ER-negative breast cancer. J. Exp. Clin. Cancer Res.: CR 36, 179.

Gao, X, Lee, K, Reid, M A, Sanderson, S M, Qiu, C, Li, S, Liu, J, Locasale, J W, 2018. Serine availability influences mitochondrial dynamics and function through lipid metabolism. Cell Reports 22, 3507–3520.

Garofalo, K, Penno, A, Schmidt, B P, Lee, H J, Frosch, M P, von Eckardstein, A, Brown, R H, Hornemann, T, Eichler, F S, 2011. Oral L-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1. J Clin. Invest. 121, 4735–4745.

Gliddon, C M, Shao, Z, LeMaistre, J L, Anderson, C M, 2009. Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. J. Neurochem. 108, 372–383.

Grant, G A, 2012. Contrasting catalytic and allosteric mechanisms for phosphoglycerate dehydrogenases. Arch. Biochem. Biophys. 519, 175–185.

Grant, G A, 2018. D-3-Phosphoglycerate dehydrogenase. Front Mol. Biosci. 5.

Gravel, S P, Hulea, L, Toban, N, Birman, E, Blouin, M J, Zakikhani, M, Zhao, Y, Topisirovic, I, St-Pierre, J, Pollak, M, 2014. Serine deprivation enhances antineoplastic activity of biguanides. Cancer Res. 74, 7521–7533.

Gui, D Y, Lewis, C A, Heiden, M G V, 2013. Allosteric regulation of PKM2 allows cellular adaptation to different. Science Signal. 6, 1–5.

Habas, A, Hahn, J, Wang, X, Margeta, M, 2013. Neuronal activity regulates astrocytic Nrf2 signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 18291–18296.

Harding, H P, Zhang, Y H, Zeng, H Q, Novoa, I, Lu, P D, Calfon, M, Sadri, N, Yun, C, Popko, B, Paules, R, Stojdl, D F, Bell, J C, Hettmann, T, Leiden, J M, Ron, D, 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol. Cell 11, 619–633.

Hardingham, G E, Bading, H, 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. Nat. Rev. Neurosci. 11, 682–696.

Hashimoto, A, Nishikawa, T, Hayashi, T, Fujii, N, Harada, K, Oka, T, Takahashi, K, 1992. The presence of free D-serine in rat-brain. FEBS Lett. 296, 33–36.

Hawkins, R A, O'Kane, R L, Simpson, I A, Vina, J R, 2006. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. J. Nutr. 136, 218S–226S.

Henneberger, C, Papouin, T, Oliet, S H, Rusakov, D A, 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. Nature 463, 232–236.

Hester, G, Stark, W, Moser, M, Kallen, J, Markovic-Housley, Z, Jansonius, J N, 1999. Crystal structure of phosphoserine aminotransferase from Escherichia coli at 2.3 angstrom resolution: Comparison of the unligated enzyme and a complex with alpha-methyl-L-glutamate. J. Mol. Biol. 286, 829–850.

Hirabayashi, Y, Furuya, S, 2008. Roles of l-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival. Progress Lipid Res. 47, 188–203.

Hitosugi, T, Zhou, L, Elf, S, Fan, J, Kang, H-B, Seo, J H, Shan, C, Dai, Q, Zhan, L, Xie, J, Gu, T-L, Jin, P, Aleckovic, M, LeRoy, G, Kang, Y, Sudderth, J A, DeBerardinis, R J, Luan, C-H, Chen, G Z, Muller, S, Shin, D M, Owonikoko, T K, Lonial, S, Arellano, M L, Khoury, H J, Khuri, F R, Lee, B H, Ye, K, Boggon, T J, Kang, S, He2, C, Chen, J, 2012. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. Cancer cell 22, 585–600.

Horio, M, Kohno, M, Fujita, Y, Ishima, T, Inoue, R, Mori, H, Hashimoto, K, 2011. Levels of D-serine in the brain and peripheral organs of serine racemase (Srr) knock-out mice. Neurochem. Int. 59, 853–859.

Hwang, I Y, Kwak, S, Lee, S, Kim, H, Lee, S E, Kim, J H, Kim, Y A, Jeon, Y K, Chung, D H, Jin, X, Park, S, Jang, H, Cho, E J, Youn, H D, 2016. Psat1-Dependent Fluctuations in α-Ketoglutarate Affect the Timing of ESC Differentiation. Cell Metab. 24, 494–501.

Ibsen, K, Marles, S, 1976. Inhibition of chicken pyruvate kinases by amino acids. Biochemistry 5, 1073–1079.

Ishigami, M, Hiraki, K, Umemura, K, Ogasawara, Y, Ishii, K, Kimura, H, 2009. A Source of Hydrogen Sulfide and a Mechanism of Its Release in the Brain. Antioxid. Redox Signal. 11, 205–214.

Jaeken, J, Detheux, M, VanMaldergem, L, Foulon, M, Carchon, H, VanSchaftingen, E, 1996. 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: An inborn error of serine biosynthesis. Arch. Dis. Child 74, 542–545.

Jaeken, J, Detheux, M, VanMaldergem, L, Frijns, J P, Alliet, P, Foulon, M, Carchon, H, VanSchaftingen, E, 1996. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency and 3-phosphoserine phosphatase deficiency: Inborn errors of serine biosynthesis. J. Inherited Metab. Dis. 19, 223–226.

Jimenez-Blasco, D, Santofimia-Castano, P, Gonzalez, A, Almeida, A, Bolanos, J P, 2015. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. Cell Death Diff. 22, 1877–1889.

Jin, C, Zhu, X, Wu, H, Wang, Y, Hu, X, 2020. Perturbation of phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) only marginally affects glycolysis in cancer cells. J. Biol. Chem. 295, 6425–6446.

Kandasamy, P, Gyimesi, G, Kanai, Y, Hediger, M A, 2018. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. Trends Biochem. Sci. 43, 752–789.

Kaplan, E, Zubedat, S, Radzishevsky, I, Valenta, A C, Rechnitz, O, Sason, H, Sajrawi, C, Bodner, O, Konno, K, Esaki, K, Derdikman, D, Yoshikawa, T, Watanabe, M, Kennedy, R T, Billard, J-M, Avital, A, Wolosker, H, 2018. ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic regulator of brain d-serine and neurodevelopment. Proc. Natl. Acad. Sci. 115, 9628–9633.

Kasai, H, Fukuda, M, Watanabe, S, Hayashi-Takagi, A, Noguchi, J, 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. Trends Neurosci. 33, 121–129.

Kim, H, Park, Y J, 2018. Links between Serine Biosynthesis Pathway and Epigenetics in Cancer Metabolism. Clin. Nutr. Res. 7, 153–160.

Kim, H Y, Heo, Y S, Kim, J H, Park, M H, Moon, J H, Kim, E, Kwon, D, Yoon, J, Shin, D, Jeong, E J, Park, S Y, Lee, T G, Jeon, Y H, Ro, S, Cho, J M, Hwang, K Y, 2002. Molecular basis for the local conformational rearrangement of human phosphoserine phosphatase. J. Biol. Chem. 277, 46651–46658.

Kim, P M, Aizawa, H, Kim, P S, Huang, A S, Wickramasinghe, S R, Kashani, A H, Barrow, R K, Huganir, R L, Ghosh, A, Snyder, S H, 2005. Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102, 2105–2110.

Klomp, L W J, de Koning, T J, Malingre, H E M, van Beurden, E A C M, Brink, M, Opdam, F L, Duran, M, Jaeken, J, Pineda, M, van Maldergem, L, Poll-The, B T, van den Berg, I E T, Berger, R, 2000. Molecular characterization of 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency - A neurometabolic disorder associated with reduced L-serine biosynthesis. Am. J. Hum. Genet. 67, 1389–1399.

Kuhl, D E, Metter, E J, Riege, W H, Markham, C H, 1984. Patterns of cerebral glucose utilization in Parkinson's disease and Huntington's disease. Ann. Neurol. 15 (Suppl), S119-125.

Labrie, V, Fukumura, R, Rastogi, A, Fick, L J, Wang, W, Boutros, P C, Kennedy, J L, Semeralul, M O, Lee, F H, Baker, G B, Belsham, D D, Barger, S W, Gondo, Y, Wong, A H, Roder, J C, 2009. Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. Hum. Mol. Genet. 18, 3227–3243.

Laxova, R, Ohara, P T, Timothy, J A D, 1972. Further example of a lethal autosomal recessive condition in sibs. J. Ment. Defic. Res. 16 139-&.

Le Douce, J, Maugard, M, Veran, J, Matos, M, Jego, P, Vigneron, P A, Faivre, E, Toussay, X, Vandenberghe, M, Balbastre, Y, Piquet, J, Guiot, E, Tran, N T, Taverna, M, Marinesco, S, Koyanagi, A, Furuya, S, Gaudin-Guerif, M, Goutal, S, Ghettas, A, Pruvost, A, Bemelmans, A P, Gaillard, M C, Cambon, K, Stimmer, L, Sazdovitch, V, Duyckaerts, C, Knott, G, Herard, A S, Delzescaux, T, Hantraye, P, Brouillet, E, Cauli, B, Oliet, S H R, Panatier, A, Bonvento, G, 2020. Impairment of glycolysis-derived L-serine production in astrocytes contributes to cognitive deficits in Alzheimer's disease. Cell Metab. 31 503-+.

Levine, T D, Miller, R G, Bradley, W G, Moore, D H, Saperstein, D S, Flynn, L E, Katz, J S, Forshew, D A, Metcalf, J S, Banack, S A, Cox, P A, 2017. Phase I clinical trial

UNCORRECTED PROOF

of safety of L-serine for ALS patients. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 18, 107–111.
Li, X J, Egervari, G, Wang, Y G, Berger, S L, Lu, Z M, 2018. Regulation of chromatin and gene expression by metabolic enzymes and metabolites. Nat. Rev. Mol. Cell. Bio. 19, 563–578.
Li, Y L, Wu, P F, Chen, J G, Wang, S, Han, Q Q, Li, D, Wang, W, Guan, X L, Li, D, Long, L H, Huang, J G, Wang, F, 2017. Activity-dependent sulfhydration signal controls N-methyl-D-aspartate subtype glutamate receptor-dependent synaptic plasticity via increasing D-serine availability. Antioxid. Redox Signal. 27, 398–414.
Li, Y L, Zhou, J, Zhang, H, Luo, Y, Long, L H, Hu, Z L, Chen, J G, Wang, F, Wu, P F, 2016. Hydrogen Sulfide Promotes Surface Insertion of Hippocampal AMPA Receptor GluR1 Subunit via Phosphorylating at Serine-831/Serine-845 Sites Through a Sulfhydration-Dependent Mechanism. CNS Neurosci. Ther. 22, 789–798.
Lin, H, Jacobi, A A, Anderson, S A, Lynch, D R, 2016. D-Serine and serine racemase are associated with PSD-95 and glutamatergic synapse stability. Front. Cell. Neurosci. 10.
Lin, M T, Beal, M F, 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 443, 787–795.
Locasale, J W, 2013. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. Nat. Rev. Cancer 13, 572–583.
Locasale, J W, Grassian, A R, Melman, T, Lyssiotis, C A, Mattaini, K R, Bass, A J, Heffron, G, Metallo, C M, Muranen, T, Sharfi, H, Sasaki, A T, Anastasiou, D, Mullarky, E, Vokes, N I, Sasaki, M, Beroukhim, R, Stephanopoulos, G, Ligon, A H, Meyerson, M, Richardson, A L, Chin, L, Wagner, G, Asara, J M, Brugge, J S, Cantley, L C, Vander Heiden, M G, 2011. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. Nat. Genet. 43, 869–874.
Lopez-Fabuel, I, Le Douce, J, Logan, A, James, A M, Bonvento, G, Murphy, M P, Almeida, A, Bolanos, J P, 2016. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 113, 13063–13068.
Lu, S C, 2009. Regulation of glutathione synthesis. Mol. Aspects Med. 30, 42–59.
Luo, H, Wu, P-F, Han, Q-Q, Cao, Y, Deng, S-L, Wang, J, Deng, Q, Wang, F, Chen, J-G, 2018. Reactive sulfur species emerge as gliotransmitters to support memory via sulfuration-dependent gating of NR2A-containing NMDA receptor function. Antioxid. Redox Signal. 5553 ars.2018.7503.
Ma, L, Tao, Y Z, Duran, A, Llado, V, Galvez, A, Barger, J F, Castilla, E A, Chen, J, Yajima, T, Porollo, A, Medvedovic, M, Brill, L M, Plas, D R, Riedl, S J, Leitges, M, Diaz-Meco, M T, Richardson, A D, Moscat, J, 2013. Control of nutrient stress-induced metabolic reprogramming by PKC zeta in tumorigenesis. Cell 152, 599–611.
Maddocks, O D K, Berkers, C R, Mason, S M, Zheng, L, Blyth, K, Gottlieb, E, Vousden, K H, 2012. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. Nature 493, 542–546.
Maddocks, O D K, Labuschagne, C F, Adams, P D, Vousden, K H, 2016. Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through De Novo ATP synthesis in cancer cells. Mol. Cell 61, 210–221.
Madeira, C, Lourenco, M V, Vargas-Lopes, C, Suemoto, C K, Brandao, C O, Reis, T, Leite, R E, Laks, J, Jacob-Filho, W, Pasqualucci, C A, Grinberg, L T, Ferreira, S T, Panizzutti, R, 2015. d-serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development. Transl. Psychiatry 5, e561.
Maekawa, M, Watanabe, M, Yamaguchi, S, Konno, R, Hori, Y, 2005. Spatial learning and long-term potentiation of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. Neurosci. Res. 53, 34–38.
Magistretti, P J, Allaman, I, 2018. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. Nat. Rev. Neurosci. 19, 235–249.
Martineau, M, Baux, G, Mothet, J P, 2006. D-serine signalling in the brain: friend and foe. Trends Neurosci. 29, 481–491.
Mattaini, K R, Sullivan, M R, Vander Heiden, M G, 2016. The importance of serine metabolism in cancer. J. Cell Biol. 214, 249–257.
Mauch, D H, Nagler, K, Schumacher, S, Goritz, C, Muller, E C, Otto, A, Pfrieger, F W, 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. Science 294, 1354–1357.
Maucler, C, Pernot, P, Vasylieva, N, Pollegioni, L, Marinesco, S, 2013. In vivo D-serine hetero-exchange through alanine-serine-cysteine (ASC) transporters detected by microelectrode biosensors. ACS Chem. Neurosci. 4, 772–781.
Maury, J J P, Chan, K K K, Zheng, L, Bardor, M, Choo, A B H, 2013. Excess of O-linked N-acetylglucosamine modifies human pluripotent stem cell differentiation. Stem Cell Res. 11, 926–937.
Mews, P, Egervari, G, Nativio, R, Sidoli, S, Donahue, G, Lombroso, S I, Alexander, D C, Riesche, S L, Heller, E A, Garcia, B A, Nestler, E J, Berger, S L, 2019. Alcohol metabolism directly fuels histone acetylation in the brain. Alcohol.-Clin. Exp. Res. 43 144a-144a.
Mitoma, J, Furuya, S, Hirabayashi, Y, 1998. A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons. Neurosci. Res. 30, 195–199.
Mosconi, L, Sorbi, S, de Leon, M J, Li, Y, Nacmias, B, Myoung, P S, Tsui, W, Ginestroni, A, Bessi, V, Fayyazz, M, Caffarra, P, Pupi, A, 2006. Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. J. Nucl. Med. 47, 1778–1786.
Mothet, J P, Parent, A T, Wolosker, H, Brady, R O, Linden, D J, Ferris, C D, Rogawski, M A, Snyder, S H, 2000. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 4926–4931.
Mullarky, E, Cantley, L C, 2015. Diverting glycolysis to combat oxidative stress. Innov. Med..
Mullarky, E, Lucki, N C, Beheshti Zavareh, R, Anglin, J L, Gomes, A P, Nicolay, B N, Wong, J C, Christen, S, Takahashi, H, Singh, P K, Blenis, J, Warren, J D, Fendt, S M, Asara, J M, DeNicola, G M, Lyssiotis, C A, Lairson, L L, Cantley, L C, 2016. Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 113, 1778–1783.
Nagata, Y, Borghi, M, Fisher, G H, Daniello, A, 1995. Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. Brain Res. Bull. 38, 181–183.
Nagata, Y, Horiike, K, Maeda, T, 1994. Distribution of free D-Serine in vertebrate brains. Brain Res. 634, 291–295.
Neame, S, Safory, H, Radzishevsky, I, Touitou, A, Marchesani, F, Marchetti, M, Kellner, S, Berlin, S, Foltyn, V N, Engelender, S, Billard, J M, Wolosker, H, 2019. The NMDA receptor activation by d-serine and glycine is controlled by an astrocytic Phgdh-dependent serine shuttle. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 116, 20736–20742.
Neu, R L, Kajii, T, 1971. Lethal syndrome of microcephaly with multiple congenital anomalies in 3 siblings. Pediatrics 47 610-&.
Oldendorf, W H, 1971. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. Am. J. Physiol. 221 1629-+.
Oliva, C A, Vargas, J Y, Inestrosa, N C, 2013. Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. Front. Cell. Neurosci. 7, 1–16.
Pacold, M E, Brimacombe, K R, Chan, S H, Rohde, J M, Lewis, C A, Swier, L J, Possemato, R, Chen, W W, Sullivan, L B, Fiske, B P, Cho, S, Freinkman, E, Birsoy, K, Abu-Remaileh, M, Shaul, Y D, Liu, C M, Zhou, M, Koh, M J, Chung, H, Davidson, S M, Luengo, A, Wang, A Q, Xu, X, Yasgar, A, Liu, L, Rai, G, Westover, K D, Vander Heiden, M G, Shen, M, Gray, N S, Boxer, M B, Sabatini, D M, 2016. A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. Nat. Chem. Biol. 12, 452–458.
Panatier, A, Theodosis, D T, Mothet, J P, Touquet, B, Pollegioni, L, Poulain, D A, Oliet, S H, 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. Cell 125, 775–784.
Papouin, T, Dunphy, J M, Tolman, M, Dineley, K T, Haydon, P G, 2017. Septal cholinergic neuromodulation tunes the astrocyte-dependent gating of hippocampal NMDA receptors to wakefulness. Neuron 94 (840–854), e847.
Papouin, T, Henneberger, C, Rusakov, D A, Oliet, S H R, 2017. Astroglial versus neuronal D-Serine: fact checking. Trends Neurosci. 40, 517–520.
Papouin, T, Ladepeche, L, Ruel, J, Sacchi, S, Labasque, M, Hanini, M, Groc, L, Pollegioni, L, Mothet, J P, Oliet, S H, 2012. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. Cell 150, 633–646.
Pasini, S, Corona, C, Liu, J, Greene, L A, Shelanski, M L, 2015. Specific down-regulation of hippocampal ATF4 reveals a necessary role in synaptic plasticity and memory Silvia. Cell reports 11, 183–191.
Paul, B D, Snyder, S H, 2018. Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health and disease. Biochem. Pharmacol..
Pind, S, Slominski, E, Mauthe, J, Pearlman, K, Swoboda, K J, Wilkins, J A, Sauder, P, Natowicz, M R, 2002. V490M, a common mutation in 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency, causes enzyme deficiency by decreasing the yield of mature enzyme. J. Biol. Chem. 277, 7136–7143.
Pollegioni, L, Sacchi, S, 2010. Metabolism of the neuromodulator D-serine. Cell. Mol. Life Sci. 67, 2387–2404.
Possemato, R, Marks, K M, Shaul, Y D, Pacold, M E, Kim, D, Birsoy, K, Sethumadhavan, S, Woo, H K, Jang, H G, Jha, A K, Chen, W W, Barrett, F G, Stransky, N, Tsun, Z Y, Cowley, G S, Barretina, J, Kalaany, N Y, Hsu, P P, Ottina, K, Chan, A M, Yuan, B, Garraway, L A, Root, D E, Mino-Kenudson, M, Brachtel, E F, Driggers, E M, Sabatini, D M, 2011. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. Nature 476, 346–350.
Powers, W J, Videen, T O, Markham, J, McGee-Minnich, L, Antenor-Dorsey, J V, Hershey, T, Perlmutter, J S, 2007. Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 104, 2945–2949.
Pritchett, D, Hasan, S, Tam, S K E, Engle, S J, Brandon, N J, Sharp, T, Foster, R G, Harrison, P J, Bannerman, D M, Peirson, S N, 2015. D-amino acid oxidase knockout (Dao(-/-)) mice show enhanced short-term memory performance and heightened anxiety, but no sleep or circadian rhythm disruption. Eur. J. Neurosci. 41, 1167–1179.
Pritchett, D, Taylor, A M, Barkus, C, Engle, S J, Brandon, N J, Sharp, T, Foster, R G, Harrison, P J, Peirson, S N, Bannerman, D M, 2016. Searching for cognitive enhancement in the Morris water maze: better and worse performance in D-amino acid oxidase knockout (Dao(-/-)) mice. Eur. J. Neurosci. 43, 979–989.
Reeds, P J, 2000. Dispensable and indispensable amino acids for humans. J. Nutr. 130, 1835s–1840s.
Reid, M A, Allen, A E, Liu, S, Liberti, M V, Liu, P, Liu, X, Dai, Z, Gao, X, Wang, Q, Liu, Y, Lai, L, Locasale, J W, 2018. Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism. Nature Commun. 9, 1–11.
Riscal, R, Schrepfer, E, Arena, G, Cissé, M Y, Bellvert, F, Heuillet, M, Rambow, F, Bonneil, E, Sabourdy, F, Vincent, C, Ait-Arsa, I, Levade, T, Thibaut, P, Marine, J C, Portais, J C, Sarry, J E, Le Cam, L, Linares, L K, 2016. Chromatin-bound MDM2 regulates serine metabolism and redox homeostasis independently of p53. Mol. Cell 62, 890–902.
Rosenberg, D, Artoul, S, Segal, A C, Kolodney, G, Radzishevsky, I, Dikopoltsev, E, Foltyn, V N, Inoue, R, Mori, H, Billard, J-M, Wolosker, H, 2013. Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates nmda receptor-dependent synaptic activity. J. Neurosci. 33, 3533–3544.
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. J. Neurosci. 23, 550–560.
Sason, H, Billard, J M, Smith, G P, Safory, H, Neame, S, Kaplan, E, Rosenberg, D, Zubedat, S, Foltyn, V N, Christoffersen, C T, Bundgaard, C, Thomsen, C, Avital, A, Christensen, K V, Wolosker, H, 2017. Asc-1 transporter regulation of synaptic activity via the tonic release of D-serine in the forebrain. Cereb. Cortex 27, 1573–1587.
Savoca, R, Ziegler, U, Sonderegger, P, 1995. Effects of L-serine on neurons in vitro. J. Neurosci. Methods 61, 159–167.
Sekula, B, Ruszkowski, M, Dauter, Z, 2018. Structural analysis of phosphoserine aminotransferase (Isoform 1) from arabidopsis thaliana-the enzyme involved in the phosphorylated Pathway of serine biosynthesis. Front Plant Sci. 9.
Shaheen, R, Rahbeeni, Z, Alhashem, A, Faqeih, E, Zhao, Q, Xiong, Y, Almoisheer, A, Al-Qattan, S M, Almadani, H A, Al-Onazi, N, Al-Baqawi, B S, Saleh, M A, Alkuraya, F S, 2014. Neu-Laxova syndrome, an inborn error of serine metabolism, is caused by mutations in PHGDH. Am. J. Hum. Genet. 94, 898–904.

UNCORRECTED PROOF

Soto, D, Olivella, M, Grau, C, Armstrong, J, Alcon, C, Gasull, X, Santos-Gomez, A, Locubiche, S, de Salazar, M G, Garcia-Diaz, R, Gratacos-Batlle, E, Ramos-Vicente, D, Chu-Van, E, Colsch, B, Fernandez-Duenas, V, Ciruela, F, Bayes, A, Sindreu, C, Lopez-Sala, A, Garcia-Cazorla, A, Altafaj, X, 2019. l-Serine dietary supplementation is associated with clinical improvement of loss-of-function GRIN2B-related pediatric encephalopathy. Sci. Signal. 12.

Sultan, S, Li, L Y, Moss, J, Petrelli, F, Casse, F, Gebara, E, Lopatar, J, Pfrieger, F W, Bezzi, P, Bischofberger, J, Toni, N, 2015. Synaptic integration of adult-born hippocampal neurons is locally controlled by astrocytes. Neuron 88.

Uhlén, M, Fagerberg, L, Hallström, B M, Lindskog, C, Oksvold, P, Mardinoglu, A, Sivertsson, Å, Kampf, C, Sjöstedt, E, Asplund, A, Olsson, I M, Edlund, K, Lundberg, E, Navani, S, Szigyarto, C A K, Odeberg, J, Djureinovic, D, Takanen, J O, Hober, S, Alm, T, Edqvist, P H, Berling, H, Tegel, H, Mulder, J, Rockberg, J, Nilsson, P, Schwenk, J M, Hamsten, M, Von Feilitzen, K, Forsberg, M, Persson, L, Johansson, F, Zwahlen, M, Von Heijne, G, Nielsen, J, Pontén, F, 2015. Tissue-based map of the human proteome. Science 347.

Unterlass, J E, Wood, R J, Baslé, A, Tucker, J, Cano, C, Noble, M M E, Curtin, N J, 2017. Structural insights into the enzymatic activity and potential substrate promiscuity of human 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH). Oncotarget 8, 104478–104491.

Veeranna, Shetty, K T, 1990. Phosphoserine phosphatase of human brain - partial-purification, characterization, regional distribution, and effect of certain modulators including psychoactive-drugs. Neurochem. Res. 15, 1203–1210.

Vicente-Gutierrez, C, Bonora, N, Bobo-Jimenez, V, Jimenez-Blasco, D, Lopez-Fabuel, I, Fernandez, E, Josephine, C, Bonvento, G, Enriquez, J A, Almeida, A, Bolaños, J P, 2019. Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. Nat. Metab. 1, 201–211.

Vitvitsky, V, Thomas, M, Ghorpade, A, Gendelman, H E, Banerjee, R, 2006. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. J. Biol. Chem. 281, 35785–35793.

Vlassenko, A G, Raichle, M E, 2015. Brain aerobic glycolysis functions and Alzheimer's disease. Clin. Transl. Imaging 3, 27–37.

Wolosker, H, Balu, D T, Coyle, J T, 2017. astroglial versus neuronal D-serine: check your controls!. Trends Neurosci. 40, 520–522.

Wolosker, H, Radzishevsky, I, 2013. The serine shuttle between glia and neurons: implications for neurotransmission and neurodegeneration. Biochem. Soc. Trans. 41, 1546–1550.

Wolosker, H, Sheth, K N, Takahashi, M, Mothet, J P, Brady, R O, Ferris, C D, Snyder, S H, 1999. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96, 721–725.

Xia, Y F, Ye, B W, Ding, J E, Yu, Y J, Alptekin, A, Thangaraju, M, Prasad, P D, Ding, Z C, Park, E J, Choi, J H, Gao, B, Fiehn, O, Yan, C H, Dong, Z, Zha, Y H, Ding, H F, 2019. Metabolic reprogramming by MYCN confers dependence on the serine-glycine-one-carbon biosynthetic pathway. Cancer Res. 79, 3837–3850.

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. J. Neurosci. 21, 7691–7704.

Yang, J H, Wada, A, Yoshida, K, Miyoshi, Y, Sayano, T, Esaki, K, Kinoshita, M O, Tomonaga, S, Azuma, N, Watanabe, M, Hamase, K, Zaitsu, 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. J. Biol. Chem. 285, 41380–41390.

Yang, M, Vousden, K, 2016. Serine and one-carbon metabolism in cancer. Nat. Rev. Cancer 104, 3104–3105.

Ye, J, Mancuso, A, Tong, X, Ward, P S, Fan, J, Rabinowitz, J D, Thompson, C B, 2012. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 109, 6904–6909.

Yizhak, K, Le Devedec, S E, Rogkoti, V M, Baenke, F, de Boer, V C, Frezza, C, Schulze, A, van de Water, B, Ruppin, E, 2014. A computational study of the Warburg effect identifies metabolic targets inhibiting cancer migration. Mol. Syst. Biol. 10 744-744.

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. J. Biol. Chem. 279, 3573–3577.

Zeisel, A, Hochgerner, H, Lönnerberg, P, Johnsson, A, Memic, F, van der Zwan, J, Häring, M, Braun, E, Borm, L E, La Manno, G, Codeluppi, S, Furlan, A, Lee, K, Skene, N, Harris, K D, Hjerling-Leffler, J, Arenas, E, Ernfors, P, Marklund, U, Linnarsson, S, 2018. Molecular architecture of the mouse nervous system. Cell 174, 999–1014 e1022.

Zhang, T, Gillies, M C, Madigan, M C, Shen, W Y, Du, J H, Grunert, U, Zhou, F F, Yam, M, Zhu, L, 2018. Disruption of de novo serine synthesis in muller cells induced mitochondrial dysfunction and aggravated oxidative damage. Mol. Neurobiol. 55, 7025–7037.

Zhang, T, Zhu, L, Madigan, M C, Liu, W, Shen, W Y, Cherepanoff, S, Zhou, F F, Zeng, S X, Du, J H, Gillies, M C, 2019. Human macular Muller cells rely more on serine biosynthesis to combat oxidative stress than those from the periphery. Elife 8.

Zhang, Y, Chen, K, Sloan, S A, Bennett, M L, Scholze, A R, O'Keeffe, S, Phatnani, H P, Guarnieri, P, Caneda, C, Ruderisch, N, Deng, S, Liddelow, S A, Zhang, C, Daneman, R, Maniatis, T, Barres, B A, Wu, J Q, 2014. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. J. Neurosci. 34, 11929–11947.

Zhang, Y, Sloan, S A, Clarke, L E, Caneda, C, Plaza, C A, Blumenthal, P D, Vogel, H, Steinberg, G K, Edwards, M S, Li, G, Duncan, J A, 3rd, Cheshier, S H, Shuer, L M, Chang, E F, Grant, G A, Gephart, M G, Barres, B A, 2016. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. Neuron 89, 37–53.

Zhao, E H, Ding, J, Xia, Y F, Liu, M L, Ye, B W, Choi, J H, Yan, C H, Dong, Z, Huang, S, Zha, Y H, Yang, L Q, Cui, H J, Ding, H F, 2016. KDM4C and ATF4 cooperate in transcriptional control of amino acid metabolism. Cell Rep. 14, 506–519.

Zhao, J, Cooper, L T, Boyd, A W, Bartlett, P F, 2018. Decreased signalling of EphA4 improves functional performance and motor neuron survival in the SOD1(G93A) ALS mouse model. Sci. Rep.-UK 8.

UNCORRECTED PROOF

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] M. Maugard, "Rôle de la sérine astrocytaire dans l'apprentissage et la mémoire et ses implications dans la maladie d'Alzheimer," Université Paris-Saclay, 2018.

[2] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fifth edit. 2008.

[3] J. W. Mink, R. J. Blumenschine, and D. B. Adams, "Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: Its constancy and functional basis," *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 10, no. 2, pp. 203–212, 1981, doi: 10.1152/ajpregu.1981.241.3.r203.

[4] H. White and B. Venkatesh, "Clinical review: Ketones and brain injury," *Crit. Care*, vol. 15, no. 2, pp. 1–10, 2011, doi: 10.1186/cc10020.

[5] S. Herculano-Houzel, "The human brain in numbers: A linearly scaled-up primate brain," *Front. Hum. Neurosci.*, vol. 3, no. NOV, pp. 1–11, 2009, doi: 10.3389/neuro.09.031.2009.

[6] J. J. Harris, R. Jolivet, and D. Attwell, "Synaptic Energy Use and Supply," *Neuron*, vol. 75, no. 5, pp. 762–777, 2012, doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019.

[7] A. Verkhratsky and O. Krishtal, "Adenosine Triphosphate (ATP) as a Neurotransmitter," in *Encyclopedia of Neuroscience*, 4th editio., Elsevier Ltd, 2009, pp. 115–123.

[8] O. Pascual, S. Ben Achour, P. Rostaing, A. Triller, and A. Bessis, "Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 4, 2012, doi: 10.1073/pnas.1111098109.

[9] R. D. Fields and G. Burnstock, "Purinergic signalling in neuron-glia interactions," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 7, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 423–436, Jun. 2006, doi: 10.1038/nrn1928.

[10] G. Soto-Heredero, M. M. Gómez de las Heras, E. Gabandé-Rodríguez, J. Oller, and M. Mittelbrunn, "Glycolysis: a key player in the inflammatory response," *FEBS J.*, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1111/febs.15327.

[11] L. P. Bernier, E. M. York, A. Kamyabi, H. B. Choi, N. L. Weilinger, and B. A. MacVicar, "Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15267-z.

[12] U. Fünfschilling *et al.*, "Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity," *Nature*, vol. 485, no. 7399, pp. 517–521, May 2012, doi: 10.1038/nature11007.

[13] V. Rangaraju, N. Calloway, and T. A. Ryan, "Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function.," *Cell*, vol. 156, no. 4, pp. 825–35, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.042.

[14] H. Hydén and P. W. Lange, "A kinetic study of the neuronglia relationship.," *J. Cell Biol.*, vol. 13, pp. 233–237, May 1962, doi: 10.1083/jcb.13.2.233.

[15] A. Hamberger and H. Hydén, "Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia.," *J. Cell Biol.*, vol. 16, pp. 521–525, Mar. 1963, doi: 10.1083/jcb.16.3.521.

[16] Y. Zhang *et al.*, "An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 36, pp. 11929–11947, 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.

[17] Y. Zhang *et al.*, "Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse," *Neuron*, vol. 89, no. 1, pp. 37–53, 2016, doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.013.

[18] A. Zeisel *et al.*, "Molecular Architecture of the Mouse Nervous System," *Cell*, vol. 174, no. 4, pp. 999-1014.e22, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.021.

[19] A. Aubert, L. Pellerin, P. J. Magistretti, and R. Costalat, "A coherent neurobiological framework for functional neuroimaging provided by a model integrating compartmentalized energy metabolism," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 10, pp. 4188–4193, Mar. 2007, doi: 10.1073/pnas.0605864104.

[20] R. Jolivet, "Deciphering neuron-glia compartmentalization in cortical energy metabolism," *Front. Neuroenergetics*, vol. 1, p. 4, 2009, doi: 10.3389/neuro.14.004.2009.

[21] P. J. Magistretti and I. Allaman, "A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging," *Neuron*, vol. 86, no. 4, pp. 883–901, 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035.

[22] I. A. Simpson, A. Carruthers, and S. J. Vannucci, "Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 27, no. 11. NIH Public Access, pp. 1766–1791, Nov. 2007, doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600521.

[23] A. Herrero-Mendez, A. Almeida, E. Fernández, C. Maestre, S. Moncada, and J. P. Bolaños, "The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 747–752, 2009, doi: 10.1038/ncb1881.

[24] P. Rodriguez-Rodriguez, E. Fernandez, A. Almeida, and J. P. Bolãos, "Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration," *Cell Death Differ.*, vol. 19, no. 10, pp. 1582–1589, Oct. 2012, doi: 10.1038/cdd.2012.33.

[25] M. Bélanger, J. Yang, J. M. Petit, T. Laroche, P. J. Magistretti, and I. Allaman, "Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 50, pp. 18338–18352, Dec. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1249-11.2011.

[26] P. G. Bittar, Y. Charnay, L. Pellerin, C. Bouras, and P. J. Magistretti, "Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 16, no. 6, pp. 1079–1089, 1996, doi: 10.1097/00004647-199611000-00001.

[27] T. Duka *et al.*, "Synaptosomal Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Composition Is Shifted toward Aerobic Forms in Primate Brain Evolution," *Brain. Behav. Evol.*, vol. 83, no. 3, pp. 216–230, 2014, doi: 10.1159/000358581.

[28] I. Lopez-Fabuel *et al.*, "Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 46, pp. 13063–13068, 2016, doi:

10.1073/pnas.1613701113.
[29] C. Vicente-Gutierrez *et al.*, "Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour," *Nature Metabolism*, vol. 1, no. 2. Nature Research, pp. 201–211, Feb. 01, 2019, doi: 10.1038/s42255-018-0031-6.
[30] A. Almeida, S. Moncada, and J. P. Bolaños, "Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 45–51, Jan. 2004, doi: 10.1038/ncb1080.
[31] J. P. Bolaños, "Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity," *J. Neurochem.*, vol. 139, pp. 115–125, Oct. 2016, doi: 10.1111/jnc.13486.
[32] A. Almeida, J. Almeida, J. P. Bolaños, and S. Moncada, "Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 26, pp. 15294–15299, Dec. 2001, doi: 10.1073/pnas.261560998.
[33] D. Y. Gui, C. A. Lewis, and M. G. Vander Heiden, "Allosteric Regulation of PKM2 Allows Cellular Adaptation to Different Physiological States," *Sci. Signal.*, vol. 6, no. 263, pp. pe7–pe7, Feb. 2013, doi: 10.1126/scisignal.2003925.
[34] B. Chaneton *et al.*, "Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2," *Nature*, vol. 491, no. 7424, pp. 458–462, Nov. 2012, doi: 10.1038/nature11540.
[35] N. D. Halim *et al.*, "Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons," *Glia*, vol. 58, no. 10, pp. 1168–1176, Aug. 2010, doi: 10.1002/glia.20996.
[36] E. Mullarky and L. C. Cantley, "Diverting glycolysis to combat oxidative stress," *Innov. Med.*, 2015, doi: 10.1007/978-4-431-55651-0.
[37] S. C. Lu, "Regulation of glutathione synthesis," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, no. 1–2. NIH Public Access, pp. 42–59, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005.
[38] J. Fan, J. Ye, J. J. Kamphorst, T. Shlomi, C. B. Thompson, and J. D. Rabinowitz, "Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production," *Nature*, vol. 510, no. 7504, pp. 298–302, Jun. 2014, doi: 10.1038/nature13236.
[39] M. Yang and K. Vousden, "Serine and one-carbon metabolism in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 104, no. 12, pp. 3104–3105, 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.81.
[40] O. Warburg, "On the origin of cancer cells," *Science (80-.).*, vol. 123, no. 3191, pp. 309–314, Feb. 1956, doi: 10.1126/science.123.3191.309.
[41] M. Lopez-Lazaro, "The Warburg Effect: Why and How Do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen?," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 8, no. 3, pp. 305–312, Apr. 2008, doi: 10.2174/187152008783961932.
[42] S. Y. Lunt and M. G. Vander Heiden, "Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 441–464, 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
[43] H. Y. Kim, B. X. Huang, and A. A. Spector, "Phosphatidylserine in the brain: Metabolism and function," *Prog. Lipid Res.*, vol. 56, no. 1, pp. 1–18, 2014, doi: 10.1016/j.plipres.2014.06.002.
[44] G. G. Somjen, "Nervenkitt: Notes on the History of the Concept of Neuroglia," 1988.
[45] N. J. Allen and B. A. Barres, "Neuroscience: Glia - more than just brain glue," *Nature*, vol. 457, no. 7230, pp. 675–677, Feb. 2009, doi: 10.1038/457675a.

[46] A. Verkhratsky and M. Nedergaard, "Physiology of Astroglia," *Physiol. Rev.*, vol. 98, no. 1, pp. 239–389, 2018, doi: 10.1152/physrev.00042.2016.

[47] A. Araque, V. Parpura, R. P. Sanzgiri, and P. G. Haydon, "Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner," *Trends Neurosci.*, vol. 22, no. 5, pp. 208–215, May 1999, doi: 10.1016/S0166-2236(98)01349-6.

[48] D. A. Rusakov, "Disentangling calcium-driven astrocyte physiology," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 16, no. 4, pp. 226–233, Apr. 2015, doi: 10.1038/nrn3878.

[49] G. Perea, M. Navarrete, and A. Araque, "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information," *Trends in Neurosciences*, vol. 32, no. 8. pp. 421–431, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001.

[50] J. G. Tasker, S. H. R. Oliet, J. S. Bains, C. H. Brown, and J. E. Stern, "Glial Regulation of Neuronal Function: From Synapse to Systems Physiology," *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 24, no. 4. pp. 566–576, Apr. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02259.x.

[51] M. M. Halassa and P. G. Haydon, "Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 335–355, Mar. 2010, doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135843.

[52] L. Pasti, A. Volterra, T. Pozzan, and G. Carmignoto, "Intracellular calcium oscillations in astrocytes: A highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ," *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 20, pp. 7817–7830, 1997, doi: 10.1523/jneurosci.17-20-07817.1997.

[53] C. R. Rose, L. Felix, A. Zeug, D. Dietrich, A. Reiner, and C. Henneberger, "Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 10. Frontiers Media S.A., p. 451, Jan. 17, 2018, doi: 10.3389/fnmol.2017.00451.

[54] M. A. Di Castro *et al.*, "Local Ca2+ detection and modulation of synaptic release by astrocytes," *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 10, pp. 1276–1284, Oct. 2011, doi: 10.1038/nn.2929.

[55] E. Shigetomi, X. Tong, K. Y. Kwan, D. P. Corey, and B. S. Khakh, "TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 1, pp. 70–80, Jan. 2012, doi: 10.1038/nn.3000.

[56] K. Zheng *et al.*, "Time-Resolved Imaging Reveals Heterogeneous Landscapes of Nanomolar Ca2+ in Neurons and Astroglia," *Neuron*, vol. 88, no. 2, pp. 277–288, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.043.

[57] A. Araque, G. Carmignoto, P. G. Haydon, S. H. R. Oliet, R. Robitaille, and A. Volterra, "Gliotransmitters travel in time and space," *Neuron*, vol. 81, no. 4. pp. 728–739, Feb. 19, 2014, doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.007.

[58] L. Groc, L. Bard, and D. Choquet, "Surface trafficking of N-methyl-d-aspartate receptors: Physiological and pathological perspectives," *Neuroscience*, vol. 158, no. 1. Pergamon, pp. 4–18, Jan. 12, 2009, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.05.029.

[59] T. Papouin *et al.*, "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists," *Cell*, vol. 150, no. 3, pp. 633–646, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.029.

[60] C. Henneberger, T. Papouin, S. H. R. Oliet, and D. A. Rusakov, "Long term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes," *Nat. Neurosci.*, vol. 463, no. 7278, pp. 232–236, 2010, doi: 10.1038/nature08673.Long.

[61] T. Papouin, C. Henneberger, D. A. Rusakov, and S. H. R. Oliet, "Astroglial versus Neuronal D-Serine: Fact Checking," *Trends Neurosci.*, vol. 40, no. 9, pp. 517–520, 2017, doi: 10.1016/j.tins.2017.05.007.

[62] H. Wolosker, D. T. Balu, and J. T. Coyle, "Astroglial Versus Neuronal D-Serine: Check Your Controls!," *Trends Neurosci.*, vol. 40, no. 9, pp. 520–522, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.tins.2017.06.010.

[63] E. Kaplan *et al.*, "ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic regulator of brain d-serine and neurodevelopment," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 38, pp. 9628–9633, 2018, doi: 10.1073/pnas.1722677115.

[64] D. Rosenberg *et al.*, "Neuronal D-Serine and Glycine Release Via the Asc-1 Transporter Regulates NMDA Receptor-Dependent Synaptic Activity," *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 8, pp. 3533–3544, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3836-12.2013.

[65] C. Maucler, P. Pernot, N. Vasylieva, L. Pollegioni, and S. Marinesco, "In vivo D-serine hetero-exchange through alanine-serine-cysteine (ASC) transporters detected by microelectrode biosensors.," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 4, no. 5, pp. 772–81, May 2013, doi: 10.1021/cn4000549.

[66] Y. H. Huang and D. E. Bergles, "Glutamate transporters bring competition to the synapse," *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 14, no. 3. pp. 346–352, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.conb.2004.05.007.

[67] X. X. Dong, Y. Wang, and Z. H. Qin, "Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 30, no. 4. pp. 379–387, Apr. 23, 2009, doi: 10.1038/aps.2009.24.

[68] K. Tanaka *et al.*, "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1," *Science (80-.).*, vol. 276, no. 5319, pp. 1699–1702, Jun. 1997, doi: 10.1126/science.276.5319.1699.

[69] M. M. Halassa, T. Fellin, and P. G. Haydon, "The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease," *Trends Mol. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 54–63, 2007, doi: 10.1016/j.molmed.2006.12.005.

[70] S. Bolton, K. Greenwood, N. Hamilton, and A. M. Butt, "Regulation of the astrocyte resting membrane potential by cyclic AMP and protein kinase A," *Glia*, vol. 54, no. 4, pp. 316–328, Sep. 2006, doi: 10.1002/glia.20384.

[71] J. A. Leis, L. K. Bekar, and W. Walz, "Potassium homeostasis in the ischemic brain," *GLIA*, vol. 50, no. 4. pp. 407–416, 2005, doi: 10.1002/glia.20145.

[72] B. R. Larsen *et al.*, "Contributions of the Na^+/K^+-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K^+ clearance and volume responses.," *Glia*, vol. 62, no. 4, pp. 608–22, Apr. 2014, doi: 10.1002/glia.22629.

[73] L. Sokoloff *et al.*, "The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat," *J. Neurochem.*, vol. 28, no. 5, pp. 897–916, May 1977, doi: 10.1111/j.1471-4159.1977.tb10649.x.

[74] L. Sokoloff, "Sites and Mechanisms of Function-Related Changes in Energy Metabolism in the Nervous System," *Dev. Neurosci.*, vol. 15, no. 3–5, pp. 194–206, 1993, doi: 10.1159/000111335.

[75] N. Rouach, A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke, and C. Giaume, "Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission," *Science (80-.).*, vol.

322, no. 5907, pp. 1551–1555, Dec. 2008, doi: 10.1126/science.1164022.
[76] A. Schurr, "Cerebral glycolysis: A century of persistent misunderstanding and misconception," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 8, no. OCT. Frontiers Media S.A., 2014, doi: 10.3389/fnins.2014.00360.
[77] L. Pellerin and P. J. Magistretti, "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 22, pp. 10625–10629, Oct. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.22.10625.
[78] L. F. Barros and B. Weber, "CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain," *J. Physiol.*, vol. 596, no. 3, pp. 347–350, Feb. 2018, doi: 10.1113/JP274944.
[79] M. Bélanger, I. Allaman, and P. J. Magistretti, "Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation," *Cell Metab.*, vol. 14, no. 6, pp. 724–738, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.
[80] G. Yellen, "Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism," *Journal of Cell Biology*, vol. 217, no. 7. Rockefeller University Press, pp. 2235–2246, Jul. 01, 2018, doi: 10.1083/jcb.201803152.
[81] G. A. Dienel, "Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function," *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 1, pp. 949–1045, Jan. 2019, doi: 10.1152/physrev.00062.2017.
[82] P. Mächler *et al.*, "In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons," *Cell Metab.*, vol. 23, no. 1, pp. 94–102, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.010.
[83] C. Ligneul *et al.*, "Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy enables cell-specific monitoring of astrocyte reactivity in vivo," *Neuroimage*, vol. 191, pp. 457–469, May 2019, doi: 10.1016/j.neuroimage.2019.02.046.
[84] B. Voutsinos-Porche *et al.*, "Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex," *Neuron*, vol. 37, no. 2, pp. 275–286, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0896-6273(02)01170-4.
[85] L. F. Barros, "Metabolic signaling by lactate in the brain," 2013, doi: 10.1016/j.tins.2013.04.002.
[86] P. J. Magistretti and I. Allaman, "Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 19, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 235–249, Apr. 01, 2018, doi: 10.1038/nrn.2018.19.
[87] S. J. Colcombe *et al.*, "Aerobic Fitness Reduces Brain Tissue Loss in Aging Humans," *J. Gerontolgy*, vol. 58A, no. 2, pp. 176–180, 2003.
[88] J. N. Barnes, "Exercise, cognitive function, and aging," *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 39, no. 2, pp. 55–62, Jun. 2015, doi: 10.1152/advan.00101.2014.
[89] A. T. Brockett, E. A. LaMarca, and E. Gould, "Physical exercise enhances cognitive flexibility as well as astrocytic and synaptic markers in the medial prefrontal cortex," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0124859.
[90] P. Bekinschtein, C. A. Oomen, L. M. Saksida, and T. J. Bussey, "Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable?," *Semin. Cell Dev. Biol.*,

vol. 22, no. 5, pp. 536–542, 2011, doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.002.
[91] S. Kujach *et al.*, "Acute Sprint Interval Exercise Increases Both Cognitive Functions and Peripheral Neurotrophic Factors in Humans: The Possible Involvement of Lactate," *Front. Neurosci.*, vol. 13, Jan. 2020, doi: 10.3389/fnins.2019.01455.
[92] A. Suzuki *et al.*, "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 810–823, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.018.
[93] L. A. Newman, D. L. Korol, and P. E. Gold, "Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing," *PLoS One*, vol. 6, no. 12, Dec. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0028427.
[94] V. Gao *et al.*, "Astrocytic β2- Adrenergic receptors mediate hippocampal long- Term memory consolidation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 30, pp. 8526–8531, Jul. 2016, doi: 10.1073/pnas.1605063113.
[95] T. Sotelo-Hitschfeld *et al.*, "Channel-mediated lactate release by K+ -stimulated astrocytes," *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 10, pp. 4168–4178, 2015, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5036-14.2015.
[96] C. Morland *et al.*, "The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 93, no. 7. John Wiley and Sons Inc., pp. 1045–1055, Jul. 01, 2015, doi: 10.1002/jnr.23593.
[97] M. B. Margineanu, H. Mahmood, H. Fiumelli, and P. J. Magistretti, "L-Lactate Regulates the Expression of Synaptic Plasticity and Neuroprotection Genes in Cortical Neurons: A Transcriptome Analysis," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, p. 375, Oct. 2018, doi: 10.3389/fnmol.2018.00375.
[98] J. Yang *et al.*, "Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 33, pp. 12228–12233, Aug. 2014, doi: 10.1073/pnas.1322912111.
[99] D. Zhang *et al.*, "Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation," *Nature*, vol. 574, no. 7779, pp. 575–580, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1678-1.
[100] V. Mosienko, A. G. Teschemacher, and S. Kasparov, "Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain?," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 35, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 1069–1075, Jul. 01, 2015, doi: 10.1038/jcbfm.2015.77.
[101] H. Roumes *et al.*, "Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 1, no. 17, Mar. 2020, doi: 10.1177/0271678X20908355.
[102] "La démence." https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia (accessed May 08, 2020).
[103] "Maladie d'Alzheimer : les chiffres de la pathologie." https://www.frm.org/recherches-maladies-neurologiques/maladie-d-alzheimer/alzheimer-en-chiffres (accessed May 08, 2020).
[104] "La maladie d'Alzheimer et la démence | France | Alzheimer's Association." https://www.alz.org/fr/demence-alzheimer-france.asp (accessed May 08, 2020).
[105] "La maladie d'Alzheimer en chiffres | France Alzheimer." https://www.francealzheimer.org/maladie-dalzheimer-vos-questions-nos-

reponses/maladie-dalzheimer-chiffres/ (accessed May 08, 2020).
[106] A. Alzheimer, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde," *Allg. Zeitschrift fur Psychiatr. und Psych. Medizin*, pp. 146–148, Jan. 1907.
[107] R. A. Stelzmann, H. Norman Schnitzlein, and F. Reed Murtagh, "An english translation of alzheimer's 1907 paper, 'über eine eigenartige erkankung der hirnrinde,'" *Clin. Anat.*, vol. 8, no. 6, pp. 429–431, 1995, doi: 10.1002/ca.980080612.
[108] A. F. Jorm, "History of depression as a risk factor for dementia: An updated review," *Aust. N. Z. J. Psychiatry*, vol. 35, no. 6, pp. 776–781, 2001, doi: 10.1046/j.1440-1614.2001.00967.x.
[109] T. P. Flaten, "Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water," in *Brain Research Bulletin*, May 2001, vol. 55, no. 2, pp. 187–196, doi: 10.1016/S0361-9230(01)00459-2.
[110] K. Blennow, M. J. de Leon, and H. Zetterberg, "Alzheimer's disease," *Lancet*, vol. 368, no. 9533, pp. 387–403, Jul. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7.
[111] S. M. de la Monte, "Quantitation of cerebral atrophy in preclinical and end-stage alzheimer's disease," *Ann. Neurol.*, vol. 25, no. 5, pp. 450–459, May 1989, doi: 10.1002/ana.410250506.
[112] J. L. Whitwell, "Progression of atrophy in Alzheimer's disease and related disorders," *Neurotox. Res.*, vol. 18, no. 3–4, pp. 339–346, Nov. 2010, doi: 10.1007/s12640-010-9175-1.
[113] L. Mosconi, "Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease: FDG-PET studies in MCI and AD," *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 32, no. 4. pp. 486–510, 2005, doi: 10.1007/s00259-005-1762-7.
[114] L. I. Binder, A. Frankfurter, and L. I. Rebhun, "The distribution of tau in the mammalian central nervous central nervous," *J. Cell Biol.*, vol. 101, no. 4, pp. 1371–1378, Oct. 1985, doi: 10.1083/jcb.101.4.1371.
[115] D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner, "Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly," *J. Mol. Biol.*, vol. 116, no. 2, pp. 227–247, Oct. 1977, doi: 10.1016/0022-2836(77)90214-5.
[116] G. T. Bramblett, M. Goedert, R. Jakes, S. E. Merrick, J. Q. Trojanowski, and V. M. Y. Lee, "Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding," *Neuron*, vol. 10, no. 6, pp. 1089–1099, 1993, doi: 10.1016/0896-6273(93)90057-X.
[117] J. Biernat, N. Gustke, G. Drewes, E. Mandelkow, and E. Mandelkow, "Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding," *Neuron*, vol. 11, no. 1, pp. 153–163, 1993, doi: 10.1016/0896-6273(93)90279-Z.
[118] A. Lathuilière *et al.*, "Motifs in the tau protein that control binding to microtubules and aggregation determine pathological effects," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13786-2.
[119] N. W. Kowall and K. S. Kosik, "Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease," *Ann. Neurol.*, vol. 22, no. 5, pp. 639–643, Nov. 1987, doi: 10.1002/ana.410220514.
[120] T. L. Spires-Jones and B. T. Hyman, "The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease," *Neuron*, vol. 82, no. 4. Cell Press, pp. 756–771,

May 21, 2014, doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.004.
[121] M. Citron, "Alzheimer's disease: Strategies for disease modification," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 5, pp. 387–398, 2010, doi: 10.1038/nrd2896.
[122] K. Ceyzériat, "Modulation de la réactivité astrocytaire par ciblage de la voie JAK2-STAT3 : Conséquences dans des modèles murins de la maladie d ' Alzheimer," Université Paris-Saclay, 2017.
[123] A. Bignami and D. Dahl, "Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 25, no. 6, pp. 466–469, Jun. 1977, doi: 10.1177/25.6.69656.
[124] B. S. Khakh and M. V. Sofroniew, "Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits," *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 7, pp. 942–952, 2015, doi: 10.1038/nn.4043.
[125] S. A. Liddelow *et al.*, "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia," *Nature*, vol. 541, no. 7638, pp. 481–487, 2017, doi: 10.1038/nature21029.
[126] S. A. Liddelow and B. A. Barres, "Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential," *Immunity*, vol. 46, no. 6. Cell Press, pp. 957–967, Jun. 20, 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006.
[127] S. Jo *et al.*, "GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease," *Nature Medicine*, vol. 20, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 886–896, 2014, doi: 10.1038/nm.3639.
[128] K. Ceyzériat *et al.*, "Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 104, Oct. 2018, doi: 10.1186/s40478-018-0606-1.
[129] U. Wilhelmsson *et al.*, "Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 46, pp. 17513–17518, Nov. 2006, doi: 10.1073/pnas.0602841103.
[130] S. Lee *et al.*, "CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models," *Am. J. Pathol.*, vol. 177, no. 5, pp. 2549–2562, 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.100265.
[131] S. Hong *et al.*, "Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models," *Science (80-.).*, vol. 352, no. 6286, pp. 712–716, May 2016, doi: 10.1126/science.aad8373.
[132] M. M. Varnum and T. Ikezu, "The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in alzheimer's disease brain," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 60, no. 4. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), pp. 251–266, Aug. 2012, doi: 10.1007/s00005-012-0181-2.
[133] R. M. Ransohoff, "A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist," *Nature Neuroscience*, vol. 19, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 987–991, Aug. 01, 2016, doi: 10.1038/nn.4338.
[134] H. Keren-Shaul *et al.*, "A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease," *Cell*, vol. 169, no. 7, pp. 1276-1290.e17, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018.
[135] C. Venegas and M. T. Heneka, "Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 101, no. 1, pp. 87–98, Jan. 2017, doi: 10.1189/jlb.3mr0416-204r.

[136] A. U. Joshi *et al.*, "Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration," *Nat. Neurosci.*, vol. 22, no. 10, pp. 1635–1648, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41593-019-0486-0.
[137] M. W. Salter and B. Stevens, "Microglia emerge as central players in brain disease," *Nature Medicine*, vol. 23, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 1018–1027, Sep. 08, 2017, doi: 10.1038/nm.4397.
[138] G. Bartzokis, P. H. Lu, and J. Mintz, "Human brain myelination and amyloid beta deposition in Alzheimer's disease," *Alzheimer's Dement.*, vol. 3, no. 2, pp. 122–125, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.jalz.2007.01.019.
[139] D. C. Dean *et al.*, "Association of amyloid pathology with myelin alteration in preclinical Alzheimer disease," *JAMA Neurol.*, vol. 74, no. 1, pp. 41–49, Jan. 2017, doi: 10.1001/jamaneurol.2016.3232.
[140] "AlzGene." http://www.alzgene.org/ (accessed May 13, 2020).
[141] E. H. Corder *et al.*, "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families," *Science (80-.).*, vol. 261, no. 5123, pp. 921–923, 1993, doi: 10.1126/science.8346443.
[142] J. Kim, J. M. Basak, and D. M. Holtzman, "The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease," *Neuron*, vol. 63, no. 3. Neuron, pp. 287–303, Aug. 13, 2009, doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.026.
[143] J. C. Lambert *et al.*, "Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 12, pp. 1452–1458, Dec. 2013, doi: 10.1038/ng.2802.
[144] C. M. Karch and A. M. Goate, "Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis," *Biological Psychiatry*, vol. 77, no. 1. Elsevier USA, pp. 43–51, Jan. 01, 2015, doi: 10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
[145] T. Jonsson *et al.*, "Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 2, pp. 107–116, Jan. 2013, doi: 10.1056/NEJMoa1211103.
[146] J. D. Ulrich, T. K. Ulland, M. Colonna, and D. M. Holtzman, "Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease," *Neuron*, vol. 94, no. 2. Cell Press, pp. 237–248, Apr. 19, 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.042.
[147] M. Robinson, B. Y. Lee, and F. T. Hane, "Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 57, no. 2, pp. 317–330, 2017, doi: 10.3233/JAD-161149.
[148] P. Raina *et al.*, "Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: Evidence review for a clinical practice guideline," *Annals of Internal Medicine*, vol. 148, no. 5. American College of Physicians, pp. 379–397, Mar. 04, 2008, doi: 10.7326/0003-4819-148-5-200803040-00009.
[149] "2019—A Year of Hope for Alzheimer's Research | ALZFORUM." https://www.alzforum.org/news/research-news/2019-year-hope-alzheimers-research (accessed May 18, 2020).
[150] R. La Joie *et al.*, "Prospective longitudinal atrophy in Alzheimer's disease correlates with the intensity and topography of baseline tau-PET," *Sci. Transl. Med.*, vol. 12, no. 524, Jan. 2020, doi: 10.1126/scitranslmed.aau5732.
[151] R. J. Bateman *et al.*, "Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited

Alzheimer's Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 9, pp. 795–804, 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1202753.

[152] B. A. Gordon *et al.*, "Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study," *Lancet Neurol.*, vol. 17, no. 3, pp. 211–212, 2018, doi: 10.1016/S1474-4422(18)30028-0.

[153] L. Mosconi, A. Pupi, and M. J. De Leon, "Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, vol. 1147, pp. 180–195, doi: 10.1196/annals.1427.007.

[154] S. Cunnane *et al.*, "Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease," *Nutrition*, vol. 27, no. 1, pp. 3–20, 2011, doi: 10.1016/j.nut.2010.07.021.

[155] D. C. Hondius *et al.*, "Profiling the human hippocampal proteome at all pathologic stages of Alzheimer's disease," *Alzheimer's Dement.*, vol. 12, no. 6, pp. 654–668, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.jalz.2015.11.002.

[156] M. A. Tarczyluk *et al.*, "Amyloid β 1-42 induces hypometabolism in human stem cell-derived neuron and astrocyte networks," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 35, no. 8, pp. 1348–1357, Aug. 2015, doi: 10.1038/jcbfm.2015.58.

[157] Y. Zilberter and M. Zilberter, "The vicious circle of hypometabolism in neurodegenerative diseases: Ways and mechanisms of metabolic correction," *J. Neurosci. Res.*, vol. 95, no. 11, pp. 2217–2235, Nov. 2017, doi: 10.1002/jnr.24064.

[158] W. Fu, D. Shi, D. Westaway, and J. H. Jhamandas, "Bioenergetic mechanisms in astrocytes may contribute to amyloid plaque deposition and toxicity," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 20, pp. 12504–12513, May 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.618157.

[159] A. Singh and W. C. Abraham, "Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease," *Experimental Brain Research*, vol. 235, no. 6. Springer Verlag, pp. 1645–1655, Jun. 01, 2017, doi: 10.1007/s00221-017-4928-1.

[160] K. V. Kuchibhotla, C. R. Lattarulo, B. T. Hyman, and B. J. Bacskai, "Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice," *Science (80-.).*, vol. 323, no. 5918, pp. 1211–1215, Feb. 2009, doi: 10.1126/science.1169096.

[161] O. Tyurikova, K. Zheng, A. Rings, A. Drews, D. Klenerman, and D. A. Rusakov, "Monitoring Ca2+ elevations in individual astrocytes upon local release of amyloid beta in acute brain slices," *Brain Res. Bull.*, vol. 136, pp. 85–90, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.12.007.

[162] R. Zorec, V. Parpura, N. Vardjan, and A. Verkhratsky, "Astrocytic face of Alzheimer's disease," *Behav. Brain Res.*, vol. 322, no. Pt B, pp. 250–257, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.bbr.2016.05.021.

[163] R. E. Sica, "Could astrocytes be the primary target of an offending agent causing the primary degenerative diseases of the human central nervous system? A hypothesis," *Med. Hypotheses*, vol. 84, no. 5, pp. 481–489, May 2015, doi: 10.1016/j.mehy.2015.02.004.

[164] S. F. Carter *et al.*, "Evidence for astrocytosis in prodromal alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: A multitracer PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG," *J. Nucl. Med.*, vol. 53, no. 1, pp. 37–46, Jan. 2012, doi: 10.2967/jnumed.110.087031.

[165] E. Rodriguez-Vieitez *et al.*, "Diverging longitudinal changes in astrocytosis and

amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer's disease.," *Brain*, vol. 139, no. Pt 3, pp. 922–36, Mar. 2016, doi: 10.1093/brain/awv404.
[166] J. Götz, L. G. Bodea, and M. Goedert, "Rodent models for Alzheimer disease," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 19, no. 10, pp. 583–598, 2018, doi: 10.1038/s41583-018-0054-8.
[167] S. Oddo *et al.*, "Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular Aβ and synaptic dysfunction," *Neuron*, vol. 39, no. 3, pp. 409–421, 2003, doi: 10.1016/S0896-6273(03)00434-3.
[168] S. Oddo, A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng, and F. M. LaFerla, "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease," in *Neurobiology of Aging*, 2003, vol. 24, no. 8, pp. 1063–1070, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012.
[169] L. M. Billings, S. Oddo, K. N. Green, J. L. McGaugh, and F. M. LaFerla, "Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice," *Neuron*, vol. 45, no. 5, pp. 675–688, 2005, doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.040.
[170] M. Olabarria, H. N. Noristani, A. Verkhratsky, and J. J. Rodríguez, "Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease," *Glia*, vol. 58, no. 7, pp. 831–838, May 2010, doi: 10.1002/glia.20967.
[171] L. K. Clinton *et al.*, "Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice," *Neurobiol. Dis.*, vol. 28, no. 1, pp. 76–82, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.nbd.2007.06.013.
[172] C. Hirata-Fukae *et al.*, "Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model," *Brain Res.*, vol. 1216, pp. 92–103, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.079.
[173] "3xTg | ALZFORUM." https://www.alzforum.org/research-models/3xtg (accessed May 21, 2020).
[174] J. Le Douce, "Altération métabolique et déficit synaptique dans la maladie d'Alzheimer : rôle de la PHGDH astrocytaire," Université Pierre et Marie Curie, 2015.
[175] J. Le Douce *et al.*, "Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease," *Cell Metab.*, vol. 31, no. 3, pp. 503-517.e8, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.004.
[176] R. Sterniczuk, M. C. Antle, F. M. Laferla, and R. H. Dyck, "Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes," *Brain Res.*, vol. 1348, pp. 149–155, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.brainres.2010.06.011.
[177] R. M. Nicholson, Y. Kusne, L. A. Nowak, F. M. Laferla, E. M. Reiman, and J. Valla, "Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models," *Brain Res.*, vol. 1347, pp. 179–185, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.084.
[178] J. P. Mothet *et al.*, "A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory," *Aging Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 267–274, Jun. 2006, doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00216.x.
[179] D. Yamazaki *et al.*, "Glial dysfunction causes age-related memory impairment in Drosophila," *Neuron*, vol. 84, no. 4, pp. 753–763, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.039.
[180] J. M. Billard, "D-Serine in the aging hippocampus," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 116. Elsevier B.V., pp. 18–24, Dec. 10, 2015, doi:

10.1016/j.jpba.2015.02.013.
[181] T. J. De Koning, K. Snell, M. Duran, R. Berger, B. T. Poll-The, and R. Surtees, "L-serine in disease and development," *Biochemical Journal*, vol. 371, no. 3. pp. 653–661, May 01, 2003, doi: 10.1042/BJ20021785.
[182] J. W. Locasale, "Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 8, pp. 572–583, 2013, doi: 10.1038/nrc3557.
[183] R. Possemato *et al.*, "Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer," *Nature*, vol. 476, no. 7360, pp. 346–350, Aug. 2011, doi: 10.1038/nature10350.
[184] K. R. Mattaini, M. R. Sullivan, and M. G. Vander Heiden, "The importance of serine metabolism in cancer," *Journal of Cell Biology*, vol. 214, no. 3. Rockefeller University Press, pp. 249–257, Aug. 01, 2016, doi: 10.1083/jcb.201604085.
[185] R. Savoca, U. Ziegler, and P. Sonderegger, "Effects of L-serine on neurons in vitro," *J. Neurosci. Methods*, vol. 61, pp. 159–167, 1995.
[186] J. Mitoma, S. Furuya, and Y. Hirabayashi, "A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: Non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons," *Neurosci. Res.*, vol. 30, no. 2, pp. 195–199, 1998, doi: 10.1016/S0168-0102(97)00113-2.
[187] W. F. Bridgers, "The biosynthesis of serine in mouse brain extracts.," *J. Biol. Chem.*, vol. 240, no. 12, pp. 4591–4597, 1965, doi: 10.1111/ajad.12639.
[188] R. A. Hawkins, R. L. O'kane, I. A. Simpson, and J. R. Viñ, "Structure of the Blood-Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids," *J. Nutr.*, pp. 218S-226S, 2006.
[189] J. W. Locasale *et al.*, "Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis," *Nat. Genet.*, vol. 43, no. 9, pp. 869–874, Sep. 2011, doi: 10.1038/ng.890.
[190] K. Yoshida *et al.*, "Targeted Disruption of the Mouse 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Gene Causes Severe Neurodevelopmental Defects and Results in Embryonic Lethality," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 5, pp. 3573–3577, 2004, doi: 10.1074/jbc.C300507200.
[191] S. Furuya *et al.*, "L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 21, pp. 11528–11533, Oct. 2000, doi: 10.1073/pnas.200364497.
[192] M. Yamasaki, K. Yamada, S. Furuya, J. Mitoma, Y. Hirabayashi, and M. Watanabe, "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.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 19, pp. 7691–704, 2001, doi: 21/19/7691 [pii].
[193] "Brain RNA-Seq." http://www.brainrnaseq.org/ (accessed Jun. 01, 2020).
[194] "Single-cell analysis of mouse cortex." http://linnarssonlab.org/cortex/ (accessed Jun. 01, 2020).
[195] J. H. Yang *et al.*, "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," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 53, pp. 41380–41390, 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.187443.
[196] S. Furuya and M. Watanabe, "Novel neuroglial and glioglial relationships mediated by L-serine metabolism," *Archives of Histology and Cytology*, vol. 66, no. 2. Arch

Histol Cytol, pp. 109–121, May 2003, doi: 10.1679/aohc.66.109.
[197] K. H. Ibsen and S. W. Maries, "Inhibition of Chicken Pyruvate Kinases by Amino Acids," *Biochemistry*, vol. 15, no. 5, pp. 1073–1079, Mar. 1976, doi: 10.1021/bi00650a018.
[198] J. Ye *et al.*, "Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 18, pp. 6904–6909, 2012, doi: 10.1073/pnas.1204176109.
[199] T. Hitosugi *et al.*, "Phosphoglycerate Mutase 1 Coordinates Glycolysis and Biosynthesis to Promote Tumor Growth," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 5, pp. 585–600, 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.020.
[200] K. Yizhak *et al.*, "A computational study of the Warburg effect identifies metabolic targets inhibiting cancer migration," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 8, p. 744, Aug. 2014, doi: 10.15252/msb.20134993.
[201] S. P. Gravel *et al.*, "Serine deprivation enhances antineoplastic activity of biguanides," *Cancer Res.*, vol. 74, no. 24, pp. 7521–7533, Dec. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2643-T.
[202] O. D. K. Maddocks *et al.*, "Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells," *Nature*, vol. 493, no. 7433, pp. 542–546, 2012, doi: 10.1038/nature11743.
[203] M. A. Reid *et al.*, "Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07868-6.
[204] A. C. Basu *et al.*, "Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior," *Mol. Psychiatry*, vol. 14, no. 617, pp. 719–727, 2009, doi: 10.1038/mp.2008.130.Targeted.
[205] M. Horio *et al.*, "Levels of d-serine in the brain and peripheral organs of serine racemase (Srr) knock-out mice," *Neurochem. Int.*, vol. 59, no. 6, pp. 853–859, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.neuint.2011.08.017.
[206] V. N. Foltyn *et al.*, "Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an α,β-elimination activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 3, pp. 1754–1763, 2005, doi: 10.1074/jbc.M405726200.
[207] M. Martineau, G. Baux, and J. P. Mothet, "d-Serine signalling in the brain: friend and foe," *Trends in Neurosciences*, vol. 29, no. 8. Trends Neurosci, pp. 481–491, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.tins.2006.06.008.
[208] H. Wolosker and I. Radzishevsky, "The serine shuttle between glia and neurons: Implications for neurotransmission and neurodegeneration," in *Biochemical Society Transactions*, Dec. 2013, vol. 41, no. 6, pp. 1546–1550, doi: 10.1042/BST20130220.
[209] S. A. Fuchs, R. Berger, and T. J. De Koning, "D-Serine: The right or wrong isoform?," *Brain Research*, vol. 1401. Elsevier B.V., pp. 104–117, Jul. 15, 2011, doi: 10.1016/j.brainres.2011.05.039.
[210] J. Zhao, L. T. Cooper, A. W. Boyd, and P. F. Bartlett, "Decreased signalling of EphA4 improves functional performance and motor neuron survival in the SOD1G93A ALS mouse model," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-29845-1.
[211] P. M. Kim *et al.*, "Serine racemase: Activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 6, pp. 2105–2110, Feb. 2005, doi:

10.1073/pnas.0409723102.
[212] L. P. Diniz *et al.*, "Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor β signaling through modulation of d-serine levels in cerebral cortex neurons," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 49, pp. 41432–41445, Nov. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.380824.
[213] S. Sultan *et al.*, "Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes," *Neuron*, vol. 88, no. 5, pp. 957–972, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.037.
[214] D. T. Balu, A. C. Basu, J. P. Corradi, A. M. Cacace, and J. T. Coyle, "The NMDA receptor co-agonists, d-serine and glycine, regulate neuronal dendritic architecture in the somatosensory cortex," *Neurobiol. Dis.*, vol. 45, no. 2, pp. 671–682, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.nbd.2011.10.006.
[215] L. M. DeVito *et al.*, "Serine racemase deletion disrupts memory for order and alters cortical dendritic morphology," *Genes, Brain Behav.*, vol. 10, no. 2, pp. 210–222, Mar. 2011, doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00656.x.
[216] H. Lin, A. A. Jacobi, S. A. Anderson, and D. R. Lynch, "D-serine and serine racemase are associated with PSD-95 and glutamatergic synapse stability," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 10, no. FEB, Feb. 2016, doi: 10.3389/fncel.2016.00034.
[217] S. M. Sanderson, X. Gao, Z. Dai, and J. W. Locasale, "Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 19, no. 11, pp. 625–637, 2019, doi: 10.1038/s41568-019-0187-8.
[218] K. Abe and H. Kimura, "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator," *J. Neurosci.*, vol. 16, no. 3, pp. 1066–1071, Feb. 1996, doi: 10.1523/jneurosci.16-03-01066.1996.
[219] H. Luo *et al.*, "Reactive Sulfur Species Emerge as Gliotransmitters to Support Memory via Sulfuration-Dependent Gating of NR2A-Containing NMDA Receptor Function," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 5553, p. ars.2018.7503, 2018, doi: 10.1089/ars.2018.7503.
[220] Y. L. Li *et al.*, "Hydrogen Sulfide Promotes Surface Insertion of Hippocampal AMPA Receptor GluR1 Subunit via Phosphorylating at Serine-831/Serine-845 Sites Through a Sulfhydration-Dependent Mechanism," *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 22, no. 9, pp. 789–798, Sep. 2016, doi: 10.1111/cns.12585.
[221] Y.-L. Li *et al.*, "Activity-Dependent Sulfhydration Signal Controls N-Methyl-D-Aspartate Subtype Glutamate Receptor-Dependent Synaptic Plasticity via Increasing d-Serine Availability," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 27, no. 7, pp. 398–414, 2017, doi: 10.1089/ars.2016.6936.
[222] G. Yang *et al.*, "Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via s-sulfhydration of keap1 and activation of Nrf2," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 18, no. 15, pp. 1906–1919, May 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4645.
[223] Y. Liu, Y. Deng, H. Liu, C. Yin, X. Li, and Q. Gong, "Hydrogen sulfide ameliorates learning memory impairment in APP/PS1 transgenic mice: A novel mechanism mediated by the activation of Nrf2," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 150–151, pp. 207–216, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.pbb.2016.11.002.
[224] G. M. DeNicola *et al.*, "NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 12, pp. 1475–1481, 2015, doi: 10.1038/ng.3421.
[225] B. D. Paul and S. H. Snyder, "Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal

health and disease," *Biochem. Pharmacol.*, 2018, doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.019.
[226] M. Ishigami, K. Hiraki, K. Umemura, Y. Ogasawara, K. Ishii, and H. Kimura, "A Source of Hydrogen Sulfide and a Mechanism of Its Release in the Brain," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 2, pp. 205–214, 2009, doi: 10.1089/ars.2008.2132.
[227] Y. Hirabayashi and S. Furuya, "Roles of l-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival," *Prog. Lipid Res.*, vol. 47, no. 3, pp. 188–203, 2008, doi: 10.1016/j.plipres.2008.01.003.
[228] D. H. Mauch *et al.*, "CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol," *Science (80-.).*, vol. 294, no. 5545, pp. 1354–1357, Nov. 2001, doi: 10.1126/science.294.5545.1354.
[229] X. Gao *et al.*, "Serine Availability Influences Mitochondrial Dynamics and Function through Lipid Metabolism," *Cell Rep.*, vol. 22, no. 13, pp. 3507–3520, 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.017.
[230] V. Vitvitsky, M. Thomas, A. Ghorpade, H. E. Gendelman, and R. Banerjee, "A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 47, pp. 35785–35793, Nov. 2006, doi: 10.1074/jbc.M602799200.
[231] T. Zhang *et al.*, "Disruption of De Novo Serine Synthesis in Müller Cells Induced Mitochondrial Dysfunction and Aggravated Oxidative Damage," *Mol. Neurobiol.*, vol. 55, no. 8, pp. 7025–7037, Aug. 2018, doi: 10.1007/s12035-017-0840-8.
[232] T. Zhang *et al.*, "Human macular müller cells rely more on serine biosynthesis to combat oxidative stress than those from the periphery," *Elife*, vol. 8, Apr. 2019, doi: 10.7554/eLife.43598.
[233] H. Kim and Y. J. Park, "Links between Serine Biosynthesis Pathway and Epigenetics in Cancer Metabolism," *Clin. Nutr. Res.*, vol. 7, no. 3, p. 153, 2018, doi: 10.7762/cnr.2018.7.3.153.
[234] H. Jakubowski, "Homocysteine Thiolactone : Metabolic Origin and Protein Homocysteinylation in Humans," *J. Nutr.*, vol. 130, no. 2, pp. 377S-381S, Feb. 2000, doi: 10.1093/JN.
[235] Q. Zhang *et al.*, "Elevated H3K79 homocysteinylation causes abnormal gene expression during neural development and subsequent neural tube defects," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–16, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05451-7.
[236] O. D. K. Maddocks, C. F. Labuschagne, P. D. Adams, and K. H. Vousden, "Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells," *Mol. Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 210–221, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.014.
[237] A. Berson, R. Nativio, S. L. Berger, and N. M. Bonini, "Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases," *Trends in Neurosciences*, vol. 41, no. 9. Elsevier Ltd, pp. 587–598, Sep. 01, 2018, doi: 10.1016/j.tins.2018.05.005.
[238] J. Jaeken *et al.*, "3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency and 3-phosphoserine phosphatase deficiency: Inborn errors of serine biosynthesis," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 19, no. 2, pp. 223–226, 1996, doi: 10.1007/BF01799435.
[239] J. Jaeken, M. Detheux, L. Van Maldergem, M. Foulon, H. Carchon, and E. Van Schaftingen, "3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: An inborn error of serine biosynthesis," *Arch. Dis. Child.*, vol. 74, no. 6, pp. 542–545, 1996, doi: 10.1136/adc.74.6.542.

[240] R. Laxova, P. T. Ohara, and J. A. D. Timothy, "A Further Example of a Lethal Autosomal Recessive Condition in Sibs," *J. Ment. Defic. Res.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 139–143, 1972, doi: 10.1111/j.1365-2788.1972.tb01585.x.

[241] R. L. Neu, T. Kajii, L. I. Gardner, and S. F. Nagyfy, "A Lethal Syndrome of Microcephaly With Multiple Congenital Anomalies in Three Siblings," *Pediatrics*, vol. 47, no. 3, 1971, doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19960614)63:3<434::AID-AJMG4>3.0.CO;2-R.

[242] R. Shaheen *et al.*, "Neu-laxova syndrome, an inborn error of serine metabolism, is caused by mutations in PHGDH," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 94, no. 6, pp. 898–904, 2014, doi: 10.1016/j.ajhg.2014.04.015.

[243] R. Acuna-Hidalgo *et al.*, "Neu-laxova syndrome is a heterogeneous metabolic disorder caused by defects in enzymes of the l-serine biosynthesis pathway," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 95, no. 3, pp. 285–293, 2014, doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.012.

[244] T. J. De Koning *et al.*, "Congenital microcephaly and seizures due to 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: Outcome of treatment with amino acids," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 25, no. 2, pp. 119–125, 2002, doi: 10.1023/A:1015624726822.

[245] A. Brassier *et al.*, "Two new cases of serine deficiency disorders treated with l-serine," *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, vol. 20, no. 1, pp. 53–60, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.ejpn.2015.10.007.

[246] A. W. El-Hattab, "Serine biosynthesis and transport defects," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 118, no. 3, pp. 153–159, 2016, doi: 10.1016/j.ymgme.2016.04.010.

[247] P. A. Cox, S. A. Banack, and S. J. Murch, "Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 23, pp. 13380–13383, Nov. 2003, doi: 10.1073/pnas.2235808100.

[248] R. A. Dunlop, P. A. Cox, S. A. Banack, and K. J. Rodgers, "The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e75376, Sep. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0075376.

[249] P. A. Cox, D. A. Davis, D. C. Mash, J. S. Metcalf, and S. A. Banack, "Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 283, no. 1823, Jan. 2016, doi: 10.1098/rspb.2015.2397.

[250] A. Kato-Kataoka, M. Sakai, R. Ebina, C. Nonaka, T. Asano, and T. Miyamori, "Soybean-Derived Phosphatidylserine Improves Memory Function of the Elderly Japanese Subjects with Memory Complaints," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 47, no. 3, pp. 246–255, 2010, doi: 10.3164/jcbn.10-62.

[251] P. A. Cox and J. S. Metcalf, "Traditional Food Items in Ogimi, Okinawa: l-Serine Content and the Potential for Neuroprotection," *Current Nutrition Reports*, vol. 6, no. 1. Current Science Inc., pp. 24–31, Mar. 01, 2017, doi: 10.1007/s13668-017-0191-0.

[252] K. Garofalo *et al.*, "Oral L-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 12, pp. 4735–4745, Dec. 2011, doi: 10.1172/JCI57549.

[253] T. D. Levine *et al.*, "Phase I clinical trial of safety of L-serine for ALS patients,"

Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener., vol. 18, no. 1–2, pp. 107–111, Jan. 2017, doi: 10.1080/21678421.2016.1221971.

[254] C. E. Ganote, D. R. Peterson, and F. A. Carone, "The Nature of D-Serine-Induced Nephrotoxicity," *Am. J. Pathol.*, vol. 77, no. 2, p. 269, 1974.

[255] B. E. Deverman *et al.*, "Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 2, pp. 204–209, 2016, doi: 10.1038/nbt.3440.

[256] J. Schindelin *et al.*, "Fiji: An open-source platform for biological-image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.

[257] "Neuro-CEB - Don du cerveau pour la recherche." https://www.neuroceb.org/fr/ (accessed May 08, 2020).

[258] H. Peng, Z. Ruan, F. Long, J. H. Simpson, and E. W. Myers, "V3D enables real-time 3D visualization and quantitative analysis of large-scale biological image data sets," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 348–353, 2010, doi: 10.1038/nbt.1612.

[259] R. Scorcioni, S. Polavaram, and G. A. Ascoli, "L-Measure: A web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 5, pp. 866–876, 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.51.

[260] H. Cuntz, F. Forstner, A. Borst, and M. Häusser, "One rule to grow them all: A general theory of neuronal branching and its practical application," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 6, no. 8, 2010, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000877.

[261] A. Rodriguez, D. B. Ehlenberger, D. L. Dickstein, P. R. Hof, and S. L. Wearne, "Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images," *PLoS One*, vol. 3, no. 4, Apr. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0001997.

[262] A. R. Spurr, "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy," *J. Ultrasructure Res.*, vol. 26, no. 1–2, pp. 31–43, 1969, doi: 10.1016/S0022-5320(69)90033-1.

[263] A. Peters and C. Folger, "A website entitled 'The fine structure of the aging brain,'" *J. Comp. Neurol.*, vol. 521, no. 6, pp. 1203–1206, 2013, doi: 10.1002/cne.23280.

[264] K. A. Janes, "An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting," *Sci. Signal.*, vol. 8, no. 371, pp. 1–31, 2016, doi: 10.1126/scisignal.2005966.An.

[265] R. M. Murphy and G. D. Lamb, "Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: Down-sizing Western blotting up-sizes outcomes," *J. Physiol.*, vol. 591, no. 23, pp. 5823–5831, 2013, doi: 10.1113/jphysiol.2013.263251.

[266] A. A. McDonough, L. C. Veiras, J. N. Minas, and D. L. Ralph, "Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 308, no. 6, pp. C426–C433, 2015, doi: 10.1152/ajpcell.00400.2014.

[267] L. Penicaud, A. Benani, F. Datiche, X. Fioramonti, C. Leloup, and F. Lienard, "Animal Models and Methods to Study the Relationships Between Brain and Tissues in Metabolic Regulation," in *Animal Models for the Study of Human Disease*, Elsevier Inc., 2013, pp. 569–593.

[268] H. Sugimoto, M. Kakehi, and F. Jinno, "Bioanalytical method for the simultaneous determination of D- and L-serine in human plasma by LC/MS/MS," *Anal. Biochem.*, vol. 487, pp. 38–44, 2015, doi: 10.1016/j.ab.2015.07.004.

[269] I. Nakano, J. D. Dougherty, K. Kim, I. Klement, D. H. Geschwind, and H. I. Kornblum,

"Phosphoserine phosphatase is expressed in the neural stem cell niche and regulates neural stem and progenitor cell proliferation," *Stem Cells*, vol. 25, no. 8, pp. 1975–1984, 2007, doi: 2007-0046 [pii]\r10.1634/stemcells.2007-0046.

[270] H. D. Protas *et al.*, "Posterior cingulate glucose metabolism, hippocampal glucose metabolism, and hippocampal volume in cognitively normal, late-middle-aged persons at 3 levels of genetic risk for alzheimer disease," *JAMA Neurol.*, vol. 70, no. 3, pp. 320–325, 2013, doi: 10.1001/2013.jamaneurol.286.

[271] N. Bergau, S. Maul, D. Rujescu, A. Simm, and A. N. Santos, "Reduction of Glycolysis Intermediate Concentrations in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer ' s Disease Patients," vol. 13, no. August, pp. 1–6, 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00871.

[272] E. C. B. Johnson *et al.*, "Large-scale proteomic analysis of Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation," *Nat. Med.*, 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0815-6.

[273] C. Madeira *et al.*, "D-serine levels in Alzheimer's disease: Implications for novel biomarker development," *Transl. Psychiatry*, vol. 5, no. January, 2015, doi: 10.1038/tp.2015.52.

[274] E. A. L. M. Biemans, N. M. Verhoeven-Duif, J. Gerrits, J. A. H. R. Claassen, H. B. Kuiperij, and M. M. Verbeek, "CSF d-serine concentrations are similar in Alzheimer's disease, other dementias, and elderly controls," *Neurobiol. Aging*, vol. 42, pp. 213–216, 2016, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.017.

[275] Z. Yan *et al.*, "Presymptomatic Increase of an Extracellular RNA in Blood Plasma Associates with the Development of Alzheimer's Disease," *Curr. Biol.*, vol. 30, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.02.084.

[276] H. J. Van De Haar *et al.*, "Blood-brain barrier leakage in patients with early Alzheimer disease," *Radiology*, vol. 281, no. 2, pp. 527–535, May 2016, doi: 10.1148/radiol.2016152244.

[277] M. D. Sweeney, A. P. Sagare, and B. V. Zlokovic, "Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders," *Nature Reviews Neurology*, vol. 14, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 133–150, Mar. 01, 2018, doi: 10.1038/nrneurol.2017.188.

[278] R. Belfiore *et al.*, "Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice," *Aging Cell*, vol. 18, no. 1, Feb. 2019, doi: 10.1111/acel.12873.

[279] K. Honarnejad and J. Herms, "Presenilins: Role in calcium homeostasis," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 44, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 1983–1986, 2012, doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.019.

[280] B. S. Khakh and K. D. McCarthy, "Astrocyte calcium signaling: From observations to functions and the challenges therein," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 4, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020404.

[281] O. Bodner *et al.*, "D-Serine signaling and NMDAR-mediated synaptic plasticity are regulated by system A-type of glutamine/D-serine dual transporters," *J. Neurosci.*, p. JN-RM-0801-20, Jul. 2020, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0801-20.2020.

[282] T. Papouin *et al.*, "Septal Cholinergic Neuromodulation Tunes the Astrocyte-Dependent Gating of Hippocampal NMDA Receptors to Wakefulness Article Septal Cholinergic Neuromodulation Tunes the Astrocyte-Dependent Gating of

Hippocampal NMDA Receptors to Wakefulness," *Neuron*, vol. 94, no. 4, pp. 840-854.e7, 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.021.

[283] A. Schousboe, S. Scafidi, L. K. Bak, H. S. Waagepetersen, and M. C. McKenna, "Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes," in *Advances in neurobiology*, vol. 11, Adv Neurobiol, 2014, pp. 13–30.

[284] Z. Li, Y. Xing, X. Guo, and Y. Cui, "Development of an UPLC–MS/MS method for simultaneous quantitation of 11 D-amino acids in different regions of rat brain: Application to a study on the associations of D-amino acid concentration changes and Alzheimer's disease," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1058, pp. 40–46, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.05.011.

[285] Y. Wang *et al.*, "TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model," *Cell*, vol. 160, no. 6, pp. 1061–1071, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.

[286] M. Orre *et al.*, "Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation anddysfunction," *Neurobiol. Aging*, vol. 35, no. 12, pp. 2746–2760, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004.

[287] J. E. Vance, "Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells," *Traffic*, vol. 16, no. 1. Blackwell Munksgaard, pp. 1–18, Jan. 01, 2015, doi: 10.1111/tra.12230.

[288] L. Zhu, M. Zhong, G. A. Elder, M. Sano, D. M. Holtzman, and S. Gandy, "Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4- associated cognitive deficits in Alzheimer ' s disease pathogenesis," vol. 112, no. 38, pp. 11965–11970, 2015, doi: 10.1073/pnas.1510011112.

[289] D. E. Berman *et al.*, "Oligomeric amyloid-β peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate metabolism," *Nat. Neurosci.*, vol. 11, no. 5, pp. 547–554, May 2008, doi: 10.1038/nn.2100.

[290] L. B. J. McIntire *et al.*, "Reduction of synaptojanin 1 ameliorates synaptic and behavioral impairments in a mouse model of Alzheimer's disease," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 44, pp. 15271–15276, Oct. 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2034-12.2012.

[291] L. Zhu *et al.*, "Reduction of synaptojanin 1 accelerates aβ clearance and attenuates cognitive deterioration in an alzheimer mouse model," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 44, pp. 32050–32063, Nov. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.504365.

[292] S. Clavreul *et al.*, "Cortical astrocytes develop in a plastic manner at both clonal and cellular levels," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12791-5.

[293] J. Mitoma, T. Kasama, S. Furuya, and Y. Hirabayashi, "Occurrence of an Unusual phospholipid, phosphatidyl-L-threonine, in cultured hippocampal neurons," *J. Biol. Chem.*, 1998.

[294] K. P. Berry and E. Nedivi, "Spine Dynamics: Are They All the Same?," *Neuron*, vol. 96, pp. 43–55, 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.08.008.

[295] S. Chakroborty *et al.*, "Reduced presynaptic vesicle stores mediate cellular and network plasticity defects in an early-stage mouse model of Alzheimer's disease," *Mol. Neurodegener.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–21, 2019, doi: 10.1186/s13024-019-0307-7.

[296] C. Genoud, C. Quairiaux, P. Steiner, H. Hirling, E. Welker, and G. W. Knott, "Plasticity of Astrocytic Coverage and Glutamate Transporter Expression in Adult Mouse Cortex," vol. 4, no. 11, pp. 2–9, 2006, doi: 10.1371/journal.pbio.0040343.

[297] R. Ventura and K. M. Harris, "Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes," vol. 19, no. 16, pp. 6897–6906, 1999.
[298] K. Kriaučiūnaitė *et al.*, "Immortalised Hippocampal Astrocytes from 3xTG-AD Mice Fail to Support BBB Integrity In Vitro: Role of Extracellular Vesicles in Glial-Endothelial Communication," *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2020, doi: 10.1007/s10571-020-00871-w.
[299] T. M. Do *et al.*, "Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease," *Neuropharmacology*, vol. 81, pp. 311–317, 2014, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.02.010.
[300] T. L. Spires *et al.*, "Dendritic Spine Abnormalities in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Demonstrated by Gene Transfer and Intravital Multiphoton Microscopy," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 31, pp. 7278–7287, 2005, doi: 10.1523/jneurosci.1879-05.2005.
[301] C. Perez-Cruz *et al.*, "Reduced Spine Density in Specific Regions of CA1 Pyramidal Neurons in Two Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 10, pp. 3926–3934, 2011, doi: 10.1523/jneurosci.6142-10.2011.
[302] H.-Y. Wu *et al.*, "Amyloid Induces the Morphological Neurodegenerative Triad of Spine Loss, Dendritic Simplification, and Neuritic Dystrophies through Calcineurin Activation," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 7, pp. 2636–2649, 2010, doi: 10.1523/jneurosci.4456-09.2010.
[303] H. Zhang *et al.*, "Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease," *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 39, pp. 13275–13286, 2015, doi: 10.1523/jneurosci.1034-15.2015.
[304] C. Procaccini *et al.*, "Role of metabolism in neurodegenerative disorders," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 65, no. 9. W.B. Saunders, pp. 1376–1390, Sep. 01, 2016, doi: 10.1016/j.metabol.2016.05.018.
[305] G. Bonvento, J. Valette, J. Flament, F. Mochel, and E. Brouillet, "Imaging and spectroscopic approaches to probe brain energy metabolism dysregulation in neurodegenerative diseases," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 37, no. 6. SAGE Publications Ltd, pp. 1927–1943, Jun. 01, 2017, doi: 10.1177/0271678X17697989.
[306] R. Inoue, K. Hashimoto, T. Harai, and H. Mori, "NMDA- and β-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 53, pp. 14486–14491, Dec. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5034-08.2008.
[307] R. Abeti, A. Y. Abramov, and M. R. Duchen, "b-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death," *Brain*, vol. 134, no. 6, 2011, doi: 10.1093/brain/awr104.
[308] A. Drews *et al.*, "Individual aggregates of amyloid beta induce temporary calcium influx through the cell membrane of neuronal cells," *Sci. Rep.*, vol. 6, Aug. 2016, doi: 10.1038/srep31910.
[309] E. Mullarky *et al.*, "Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 7, pp. 1778–1783, 2016, doi: 10.1073/pnas.1521548113.
[310] Z. Esposito, L. Belli, S. Toniolo, G. Sancesario, C. Bianconi, and A. Martorana, "Amyloid

β, glutamate, excitotoxicity in alzheimer's disease: Are we on the right track?," *CNS Neuroscience and Therapeutics*, vol. 19, no. 8. CNS Neurosci Ther, pp. 549–555, Aug. 2013, doi: 10.1111/cns.12095.

[311] H. Javadzadeh, "Measuring Brain Serine With Proton Magnetic Resonance Spectroscopy At 3.0 Tesla," The University of Western Ontario, 2016.

[312] A. D. Sauerbeck *et al.*, "SEQUIN Multiscale Imaging of Mammalian Central Synapses Reveals Loss of Synaptic Connectivity Resulting from Diffuse Traumatic Brain Injury," *Neuron*, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1016/j.neuron.2020.04.012.

[313] "Phase IIa L-serine Trial for eAD - ClinicalTrials.gov." https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03062449?term=serine&cond=Alzheimer+Disease&draw=2&rank=1 (accessed Jul. 22, 2020).

[314] L. Gándara, L. Durrieu, C. Behrensen, and P. Wappner, "A genetic toolkit for the analysis of metabolic changes in Drosophila provides new insights into metabolic responses to stress and malignant transformation," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-56446-3.

[315] B. Pardo and L. Contreras, "Redox Shuttles in the Brain," *Adv. Neurobiol. Neural Metab. vivo*, vol. 4, pp. 841–883, 2012, doi: 10.1007/978-1-4614-1788-0_29.

[316] K. P. Lehre, L. M. Levy, O. P. Ottersen, J. Storm-Mathisen, and N. C. Danbolt, "Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: Quantitative and immunocytochemical observations," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 3 I, pp. 1835–1853, 1995, doi: 10.1523/jneurosci.15-03-01835.1995.

[317] S. Holmseth *et al.*, "The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation," *Neuroscience*, vol. 162, no. 4, pp. 1055–1071, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.048.

[318] M. R. Van Horn, M. Sild, and E. S. Ruthazer, "D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. April, pp. 1–13, 2013, doi: 10.3389/fncel.2013.00039.

[319] H. Eagle, "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures," *Science (80-.).*, vol. 130, no. 3373, pp. 432–437, 1959, doi: 10.1126/science.130.3373.432.

[320] Y. Lee, A. Messing, M. Su, and M. Brenner, "GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression," *Glia*, vol. 56, no. 5, pp. 481–493, 2008, doi: 10.1002/glia.20622.

[321] S. J. Gray *et al.*, "Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors," *Hum. Gene Ther.*, vol. 22, no. 9, pp. 1143–1153, 2011, doi: 10.1089/hum.2010.245.

[322] E. K. O. Ng *et al.*, "Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the Plasma of Cancer Patients and Healthy Individuals," *Clin. Chem.*, vol. 48, no. 8, pp. 1212–1217, 2002.

[323] M. Noerholm *et al.*, "RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls," *BMC Cancer*, vol. 12, Jan. 2012, doi: 10.1186/1471-2407-12-22.

[324] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659, Jun. 2007, doi:

10.1038/ncb1596.

[325] H. Iguchi, N. Kosaka, and T. Ochiya, "Secretory microRNAs as a versatile communication tool," *Commun. Integr. Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 478–481, Sep. 2010, doi: 10.4161/cib.3.5.12693.

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)

Titre : Le métabolisme astrocytaire de la L-sérine et ses implications dans la maladie d'Alzheimer : une potentielle approche thérapeutique

Mots-clefs : Maladie d'Alzheimer, Astrocyte, Métabolisme énergétique, L-sérine, Lipides, Reconstruction 3D

Résumé : Les pertes de mémoire et les changements comportementaux sont les premiers signes de la maladie d'Alzheimer (MA). Les patients présentent souvent un métabolisme du glucose diminué, observable par TEP 18F-fluorodésoxyglucose. L'implication de cette perturbation du métabolisme du glucose dans la pathogenèse de la MA n'est pas connue. Dans le cerveau, le glucose est oxydé pour produire l'ATP nécessaire à l'activité synaptique. Cependant, des observations récentes suggèrent qu'une altération de la glycolyse aérobie survient de façon précoce dans la MA. Le *phosphorylated pathway* dévie le 3-phosphoglycérate du flux glycolytique pour la production *de novo* de L-sérine, via trois enzymes (PHGDH, PSAT1, PSPH). Les astrocytes sont la principale source de L-sérine dans le cerveau. Nous émettons l'hypothèse qu'une perturbation de la production astrocytaire de L-sérine, due à l'altération du métabolisme énergétique, puisse participer à l'établissement des déficits observés dans la MA. Nous avons utilisé le modèle murin 3xTg-AD, récapitulant les déficits métaboliques et synaptiques en plus des pathologies tau et amyloïde de la MA. Nous avons mis en évidence une diminution de la concentration en L-sérine dans l'hippocampe de ces souris. En conséquence, nous les avons nourries avec un régime enrichi à 10% en L-sérine pendant deux mois, ayant pour résultat d'améliorer leurs déficits synaptique et cognitif. Dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents à cet effet bénéfique de la L-sérine, nous nous sommes intéressés au métabolisme des lipides. Par analyse 3D de la morphologie cellulaire, nous avons mis en évidence une diminution du territoire couvert par les astrocytes de ces souris, déficit pouvant être amélioré par le régime L-sérine. Pour identifier l'impact de cette diminution sur la neurotransmission, nous avons évalué la couverture astrocytaire des synapses de l'hippocampe par microscopie électronique. Ensemble, ces résultats suggèrent un rôle critique de la L-sérine astrocytaire dans la plasticité synaptique et la mémoire.

Title : The astrocytic L-serine metabolism and its implications in Alzheimer's disease: a potential therapeutic approach

Keywords : Alzheimer's disease, Astrocyte, Energy metabolism, L-serine, Lipids, 3D-Reconstruction

Abstract : Subtle losses of memory or changes in behavior are the first outward signs of Alzheimer's disease (AD). AD patients often display concomitant reduced glucose metabolism as observed by 18F- fluorodeoxyglucose PET. Whether such energy metabolism deficit contributes to cognitive impairment in AD is still not known. In the brain, oxidative use of glucose provides most of the ATP required to fuel synaptic activity. However, recent observations suggest that changes in aerobic glycolysis prevail in the early phase of AD. The phosphorylated pathway diverts 3-phosphoglycerate from the glycolytic flux, to produce *de novo* L-serine through the action of three enzymes (PHDGH, PSAT1 and PSPH). Astrocytes are the main source of L-serine in the brain. We made the hypothesis that a dysfunction in astrocyte L-serine production, resulting from an altered energy metabolism, could participate in the deficits observed in AD. We used 3xTg-AD mice, a mouse model that recapitulates metabolic and synaptic deficits in addition to classical AD hallmarks. We measured the level of L-serine in the hippocampus of these mice and found it was decreased compared to controls. Consequently, we supplemented them with a 10%-L-serine-enriched diet during 2 months, which rescued their synaptic and cognitive deficits. To unveil the mechanisms underlying such beneficial effects of L-serine we focused on its participation in lipid synthesis. We analyzed cell morphology using 3D-reconstruction and found neuron morphology was not altered but the territory covered by astrocytes was decreased and could be fully restored by L-serine diet. To further identify the impact of this diminution on neurotransmission we assessed the astrocytic coverage of hippocampal synapses, using electron microscopy. Together, these results suggest a critical role for astrocyte L-serine in synaptic plasticity and memory.