

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1797

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologies, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 décembre 2010

Par Fabrice TURPIN

Né le 18 novembre 1978 à Vincennes (94)

**Rôle de la D-sérine dans les interactions entre systèmes
dopaminergique et glutamatergique dans le cortex
préfrontal du rat adulte**

Membres du jury

Mme Catherine Le Moine (Directrice de Recherche, CNRS)

M. Jean-Antoine Girault (Directeur de Recherche, INSERM)

M. Jean-Marie Billard (Chargé de Recherche, CNRS)

M. Mark J. Millan (Directeur de Recherche, SERVIER)

M. Yann Humeau (Chargé de Recherche, CNRS)

M. Jean-Pierre Mothet (Chargé de Recherche, CNRS)

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Il n'y a pas de honte à préférer le bonheur

Albert Camus

A mes grands-parents

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, Madame Catherine Le Moine pour présider cette soutenance, Messieurs Jean-Antoine Girault et Jean-Marie Billard pour le juger, Messieurs Mark Millan et Yann Humeau pour l'examiner.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon chef, Jean-Pierre Mothet pour m'avoir soutenu durant toutes ces années. Tu as su me transmettre une rigueur toute scientifique mais surtout une passion. Nous n'avons pas toujours été en accord et c'est grâce à cela que j'en sors grandi, prêt à affronter la réalité. J'espère juste que tu auras autant appris de moi que j'ai appris de toi. N'oublie pas que tu me dois une raquette de squash, à moins que ce ne soit moi...

Toute ma gratitude va à Stéphane Oliet qui m'a accueilli dans son équipe et a su me faire partager son enthousiasme ainsi que pour les conseils qu'il m'a prodigués.

Je tiens tout particulièrement à remercier les laboratoires Servier et plus précisément, Mark Millan et Jean-Michel Rivet, qui au delà du financement de ce projet, ont apporté une expertise indispensable pour mener à bien ce projet.

Je remercie vivement Dionysia Theodosis et Dominique Poulain pour le soutien qu'ils m'ont apporté et l'amitié dont ils ont bien voulu m'honorer.

Je tiens à dire un immense merci à Jean-Marc Israel pour l'amitié qu'il me témoigne tous les jours. Le petit surnom que tu nous donnes, et que je tairai ici, va me manquer !

Un grand merci à Valérie Fénelon pour toute l'affection dont elle a fait part à mon égard.

Je ne voudrais pas oublier Philippe Ciofi pour son humour très 'imagé' qui m'a souvent bien fait rire.

Un immense merci à mes amis bordelais, Peggy, les deux boby : Jérôme et Vincent, Pascal, Caroline, Bénédicte, Christophe, Ines, Elodie, Arnaud, Sandra, Cedric, Cairan sans oublier Nadia et Jacques pour la confiance et le respect dont ils me font part tous les jours, c'est bien plus que de l'amitié et c'est ma plus grande richesse...

Je voudrais également remercier tous les autres membres du laboratoire, Aurélie, Clémence, Isabelle, Nathalie, Daniel, Federico, Francis, Thomas et Yan sans eux rien ne serait possible.

Je voudrais adresser ma plus profonde reconnaissance à mes parents pour avoir fait de moi ce que je suis. De m'avoir soutenu contre vents et marées et Dieu sait que ça n'a pas toujours été facile. Je n'oublierai jamais ce que vous m'avez dit : fais ce qui te plaît, nous serons toujours là. Merci à ma sœur, à mon frère et à mon neveu pour m'avoir épaulé lorsque j'en avais besoin, d'avoir partagé tous ces moments de bonheur avec moi. Merci tout simplement d'être ce que vous êtes.

J'ai gardé le meilleur pour la fin, tu sais que je ne suis jamais prolix alors je vais me contenter de répondre à une de tes questions : « ça sera où chez nous ? Je ne sais pas, mais je sais que ce sera ensemble... »TQM

Résumé

Le cortex préfrontal (PFC) est le principal locus des perturbations dans l'activité des réseaux de neurones chez les schizophrènes. Ces perturbations résultent d'une dérégulation des interactions entre le système dopaminergique et le système glutamatergique dont l'origine demeure inconnue. Il est acquis que les cellules gliales détectent et intègrent les signaux synaptiques, et libèrent différentes substances neuroactives comme la D-sérine. Cet acide aminé est aujourd'hui reconnu comme le coagoniste endogène des récepteurs au glutamate de type NMDA dans de nombreuses aires cérébrales. Mon travail de thèse est centré sur le rôle de la D-sérine dans la transmission synaptique excitatrice glutamatergique dans le PFC du rongeur adulte et dans la gouvernance des interactions entre systèmes glutamatergique et dopaminergiques. J'ai tout d'abord montré en utilisant des enregistrements électrophysiologiques sur tranches que la D-sérine est le coagoniste des récepteurs NMDA synaptiques dans les couches V/VI du PFC. Cet acide aminé est synthétisé par les astrocytes et contrôle l'induction de la potentialisation à long terme. D'autre part, j'ai montré que la dopamine exerce un effet biphasique sur l'activité des récepteurs NMDA synaptiques et sur l'excitabilité des neurones pyramidaux des couches V/VI du PFC et ce en contrôlant la libération de D-sérine. Une approche pharmacologique sélective a permis de mettre en évidence le rôle des récepteurs D1 dans les effets potentialisateurs et le rôle des récepteurs D2/D3 dans les effets inhibiteurs de la dopamine. Mon travail démontre que les astrocytes arborent des récepteurs de la dopamine qui contrôlent la libération de la D-sérine.

Mots clés : Astrocyte, cortex préfrontal, dopamine, D-sérine, glutamate, récepteur NMDA, schizophrénie, synapse.

Summary

The prefrontal cortex (PFC) is the main locus where dysfunctions of neuronal networks are evident in schizophrenia. These dysfunctions are caused by an impairment of cross-talk between dopaminergic and glutamatergic systems whose origin is unknown. It is now accepted that glia detect and integrate synaptic signals and then release many neuroactive substances such as D-serine. This amino acid is now considered to be the endogenous coagonist of the NMDA subtype receptors for glutamate in many brain areas. My PhD work focuses on the functions of D-serine in glutamatergic excitatory synaptic transmission in the PFC of adult rodent and in governing the interactions between dopaminergic and glutamatergic systems. First, using electrophysiological recordings on brain slices, I have shown that D-serine is the coagonist of synaptic NMDA receptors in layers V/VI of PFC. This amino acid is synthesized by glia and is crucial for the induction of long term potentiation. In addition, I have shown that dopamine has a bell-shape effect on the activity of synaptic NMDA receptors and on the excitability of excitatory pyramidal neurons by controlling the release of D-serine. The use of specific pharmacological tools allowed me to show the potentiating effects of dopamine are mediated by D1 receptors whereas the inhibitory effects are due to the activation of D2/D3 receptors. Finally, my work highlights the presence of functional dopaminergic receptors on astrocytes that modulate the release of D-serine in the PFC, thus impacting NMDA receptor activity.

Key words: Astrocyte, prefrontal cortex, dopamine, D-serine, glutamate, NMDA receptors, schizophrenia, synapse.

Table des matières.

Liste des principales abréviations.	13
Introduction	16
Partie 1, La schizophrénie	16
1.1 Epidémiologie et étiologie.	16
1.2 Tableau clinique.	17
1.3 Bases neuroanatomiques et fonctionnelles de la schizophrénie.	19
1.3.1 Bases neuroanatomiques	19
1.3.2 Bases fonctionnelles.	21
1.4 Hypothèse dopaminergique de la schizophrénie.	22
1.4.1 La dopamine, métabolisme et projections dans le SNC.	23
Biosynthèse.	23
Voies dopaminergiques dans le SNC.	26
1.4.2 Récepteurs de la dopamine et localisations cellulaires.	27
Classifications des récepteurs dopaminergiques.	27
Localisations cellulaires et subcellulaires des récepteurs de la dopamine.	31
1.4.3 Altérations des voies dopaminergiques dans la schizophrénie.	32
Evidence pharmacologique.	32
Etude post-mortem et imagerie cérébrale.	33
1.5 Hypothèse glutamatergique de la schizophrénie.	35
1.5.1 Le récepteur NMDA.	36
Structure.	37
Sous-unités.	38
Rôles physiologiques à la synapse du récepteur NMDA.	40
1.6 Hypothèse GABAergique	44
1.7 Génétique et schizophrénie.	45

Partie 2 Cortex préfrontal et interactions entre dopamine et glutamate.	51
2.1 Anatomie et connectivité	51
2.2 Interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique du SNC	54
2.2.1 Interactions neurochimiques et organisation morphologique	55
2.2.2 Interactions Glu-DOPA à l'échelle de la synapse	58
2.2.3 Interactions entre récepteurs glutamatergiques et dopaminergiques.	62
Partie 3: La synapse tripartite.	65
3.1 Les cellules gliales d'un point de vue historique.	65
3.2 Les différents types de cellules gliales du système nerveux.	66
3.3 La synapse tripartite : le troisième élément.	66
3.4 Détection astrocytaire du signal synaptique.	67
3.5 Intégration astrocytaire du signal synaptique.	68
3.6 La gliotransmission.	69
3.6.1 Le glutamate.	70
3.6.2 L'ATP.	71
3.6.3 La taurine.	73
3.6.4 Le GABA.	73
3.6.5 La d-sérine.	74
Partie 4 : la d-serine.	75
4.1 Historique.	75
4.2 Métabolisme: synthèse.	76
4.3 Métabolisme : catabolisme.	78
4.5 Distribution.	80
4.6 Régulation de la transmission et de la plasticité synaptique.	81
4.7 d-sérine et pathologies.	83

Hypothèse de travail et objectifs.	87
Matériels et méthodes	91
1. Electrophysiologie.	91
<i>1.1 Animaux et conditions d'anesthésie.</i>	<i>91</i>
<i>1.2 Préparation des tranches aiguës de cortex préfrontal.</i>	<i>91</i>
1.3 Enregistrements électrophysiologiques.	93
1.3.1 Principe général.	93
1.3.2 Acquisition.	95
1.3.3 Enregistrements en mode voltage imposé.	95
1.3.4 Enregistrements en mode courant imposé.	96
1.3.5 Expériences de potentialisation à long terme.	96
2. Culture cellulaire.	97
3. Reverse Transcriptase et Polymerase Chain Reaction.	98
<i>3.1 Vérification de la qualité es ARNm totaux.</i>	<i>99</i>
<i>3.2 Transcription inverse.</i>	<i>99</i>
<i>3.3 Réaction de polymérase en chaîne.</i>	<i>100</i>
<i>3.4 Electrophorèse des amplicons.</i>	<i>101</i>
4. Immunocytochimie.	101
<i>4.1 Immunomarquage sur astrocytes en culture primaire.</i>	<i>101</i>
4.2 Immunomarquage sur tranches de cerveau.	102
4.2.1 Fixation et préparation du tissu.	102
4.2.2 Immunomarquages	102
4.3 Imagerie confocale.	103
5. Séparation des acides aminés par électrophorèse capillaire.	104
5.1 Principe.	104

<i>5.2 Préparation des échantillons pour l'analyse des acides aminés.</i>	105
<i>5.3 Séparation des acides aminés - Analyse.</i>	105
Mesure de la libération d'acides aminés par les astrocytes.	106
Substances pharmacologiques et enzymes.	106
8. Analyse des données et statistiques.	107
Résultats et discussion.	110
Partie 1, publication 1 :	110
Partie 2, interaction entre systèmes dopaminergique et glutamatergique dans le cortex préfrontal de rat.	144
<i>2.1 Effet modulateur de la dopamine sur la transmission glutamatergique et implication de la d-sérine.</i>	144
2.1.1 L'effet biphasique de la dopamine sur la transmission glutamatergique implique la d-sérine.	145
2.1.2 Les récepteurs de type D2 modulent la transmission synaptique via la d-sérine.	149
2.1.3 Les récepteurs D1 modulent la transmission synaptique.	155
<i>2.2 Effet modulateur de la dopamine sur l'excitabilité des neurones pyramidaux du PFC et implication de la d-sérine.</i>	157
<i>2.3. Modulation par la dopamine de la libération de d-sérine par les astrocytes.</i>	163
Conclusions et perspectives.	173
Bibliographie	178
Bibliographie	179
Publications personnelles	197

Liste des principales abréviations.

AC : adenylyl cyclase

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

AP5/APV : D-2-amino-5-phosphonovalerate

Bret : bioluminescence resonance energy transfer

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CAM : calcium calmoduline

CAMK II : calcium calmoduline kinase II

$[Ca^{2+}]_i$: calcium intracellulaire

COMT : catechol-O-methyl transferase

DARPP-32 : dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein

DTNBP1: dystrobrevin binding protein 1

EPSC : excitatory postsynaptic current

GABA : γ -aminobutyric acid

GABAT : GABA transaminase

GAD : glutamic acid decarboxylase

GCP II : glutamate carboxypeptidase II

GO : glycine oxidase

GSK 3 : glycogen synthase kinase-3

IP_3 : inositol triphosphate

LTD : long-term depression

LTP : long-term potentiation

MAO A : monoamine oxidase A

MAO B : monoamine oxidase B

MAP : mitogen activated protein

NAAG : N-acetyl-aspartyl-glutamate

NAc : noyau accumbens

NBQX : 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NRG-1 : neuregulin 1

PCC : phospholipase C

PCP : phencyclidin

PFC : cortex préfrontal

PI₃K : phosphatidylinositol 3-kinase

PKA : protein kinase A

PKC : protein kinase C

PSD-95 : postsynaptic density 95

RgDAAO : D-amino acid oxidase

RTK : receptor tyrosine kinase

SAP90 : synapse associated protein 90

SNC : système nerveux central

SR : serine racemase

Introduction

Introduction

Partie 1, La schizophrénie

1.1 Epidémiologie et étiologie.

La schizophrénie est une maladie mentale sévère qui affecte entre 0,5 et 1 % de la population mondiale, sans distinction de sexe, de localisation géographique (urbaine ou rurale) ou d'ethnies (Bhugra 2005). Toutefois, plusieurs études ont démontré une prévalence plus importante pour les immigrants et pour les pays de l'hémisphère nord (McGrath et al. 2008). En 1999, une étude de l'organisation mondiale de la santé (OMS) portant sur 14 pays a classé les psychoses, dont fait partie la schizophrénie, comme la troisième pathologie la plus invalidante devant d'autres pathologies comme la paraplégie, la cécité ou les retards mentaux (Ustun et al. 1999). La schizophrénie est un véritable problème de santé publique représentant 1,6 à 2,6 % des dépenses totales de santé (OMS, *Schizophrenia and public health*, 1998) soit le 7^{ème} poste le plus important des dépenses de santé (Ross et al. 2006). Par ailleurs, la comorbidité est très importante du fait de la consommation de substances addictives, du handicap et du risque de suicide (environ 5 %) associé à la maladie. En conséquence, les patients schizophrènes ont une espérance de vie réduite de 10 à 12 ans par rapport à la population générale.

La schizophrénie est une psychose. Selon la classification établie par le psychiatre allemand. Emil Kraepelin dans son *6^{ème} Traité de psychiatrie*, on distingue les psychoses maniaco-dépressives et les démences précoces. Les psychoses maniaco-dépressives sont caractérisées par une fluctuation anormale de l'humeur entre périodes d'excitation marquées (ou manies) et mélancolie profonde. Elle fut par la suite renommée *trouble bipolaire*. Les démences précoces apparaissent chez l'adolescent ou le jeune adulte, par opposition aux démences séniles rencontrées chez les personnes âgées. En 1908, le psychiatre suisse Eugen Bleuler, renomme les démences précoces en schizophrénie, du grec «schizo» signifiant fractionnement

et de «phrèn» désignant l'esprit. Selon cette définition, la schizophrénie représente une rupture des fonctions cognitives et comportementales et qui a été souvent et trop simplement associée par le grand public, à un dédoublement de personnalité.

Cette pathologie se manifeste par une triade de symptômes, allant des troubles cognitifs au désordre affectif, en passant par une altération de la perception de *soi*. Toutefois, l'origine de ces symptômes demeure incertaine. La schizophrénie est une maladie multifactorielle, avec des prédispositions génétiques ainsi que des facteurs environnementaux. Les enfants dont l'un des parents du premier degré (père, mère, frère, sœur) est atteint de schizophrénie, présentent un risque accru (10 %) de la développer à l'adolescence (Polanczyk et al. 2010). D'autre part, un enfant a 40 % de risque de développer la maladie si son vrai jumeau est atteint de cette pathologie. Il y a donc un facteur d'héritabilité (Cardno et al. 1999). Les études de liens génétiques les plus récentes indiquent qu'il y a de façon non exhaustive au minimum une vingtaine de gènes, codant pour des protéines du fonctionnement cérébral et synaptique, qui sont impliqués dans la physiopathologie. L'environnement semble aussi jouer un rôle prépondérant. En effet, au cours de la vie foétale, l'infection de la mère par certains virus, comme la rubéole, la grippe ou l'herpès augmente le risque, pour l'enfant, de développer la schizophrénie à l'adolescence. Ce facteur de risque est d'autant plus important lorsque la mère est infectée au premier stade de la grossesse (sept fois plus important dans le cas de la grippe) par rapport à un stade plus tardif (3 fois plus de risques si l'infection intervient entre le 3^{ème} et le 5^{ème} mois et aucun risque après 6 mois de grossesse : Brown 2006).

1.2 Tableau clinique.

La schizophrénie est une pathologie qui se déclare principalement entre 15 et 35 ans ; chez l'homme, les premiers symptômes sont plus précoces que chez la femme. Il n'existe à l'heure actuelle aucun test biologique permettant de dépister cette pathologie car certains symptômes sont communs avec d'autres pathologies comme les troubles bipolaires. Le dépistage repose donc sur un diagnostic différentiel. Le diagnostic de schizophrénie est posé lorsque les trois types de

symptômes : positif, négatif et cognitifs sont rencontrés chez le patient (Lewis and Gonzalez-Burgos 2006).

Les symptômes positifs, également appelés aigus, se traduisent par des manifestations qui s'ajoutent aux fonctions mentales normales. Ce sont souvent les premiers symptômes «visibles» de la schizophrénie et ils se manifestent chez l'homme entre 17 et 23 ans et entre 21 et 27 ans chez la femme. Le patient peut présenter seul ou en combinaison :

- des hallucinations, le plus souvent auditives mais aussi olfactives ou tactiles ;
- des délires qui se traduisent par un sentiment de persécution, paranoïa et une sensation que son corps est contrôlé par une autre personne.
- une incohérence de langage : le patient formule des phrases incompréhensibles ou invente des mots.

Les symptômes négatifs se manifestent par une dégradation ou une absence de fonction normale, et sont extrêmement délétères, plongeant ainsi le patient dans une phase de repliement sur lui-même et se traduisent par :

- la sensation d'isolement : le patient se coupe au fur et à mesure de tous liens sociaux aussi bien avec ses amis que sa famille et se replie sur lui-même ;
- des déficits de motivation et l'apathie ;
- l'anhédonie ou perte de plaisir ;
- une pauvreté du langage qui se manifeste aussi bien au niveau de la quantité (le patient communique de moins en moins) que de la qualité.

Les symptômes cognitifs font partie des premiers signes de la pathologie et ce sont ceux qui persisteront le plus longtemps. Les traitements actuels ne sont que peu ou pas efficaces contre ces symptômes. On rencontre de manière quasiment systématique, de façon plus ou moins prononcée les troubles suivants :

- Troubles de l'attention et de concentration qui se manifestent par une incapacité à réagir à une situation demandant une réaction rapide ou à se concentrer sur une tâche simple.
- Troubles de la mémoire avec, pour principale conséquence, l'oubli des tâches de la vie quotidienne. On trouve aussi une altération de la mémoire de travail, aussi

appelée *mémoire à court terme*, qui permet de stocker et de manipuler des informations pendant de courtes périodes lors de la réalisation d'une activité.

- Troubles des fonctions exécutives. Ces fonctions correspondent aux capacités nécessaires à une personne pour s'adapter à des situations nouvelles, c'est-à-dire non routinières, pour lesquelles il n'y a pas de solution toute faite.

Suivant le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-IV-TR), la schizophrénie est divisée en cinq grandes familles :

1.Type catatonique : le patient présente une immobilité motrice associée à une posture rigide de type poupée de cire (le patient conserve la posture qu'on lui a donné). Par opposition, il peut présenter des phases d'activité motrice excessive alors qu'il n'est pas sollicité. Il est par ailleurs enfermé dans un mutisme ou répète toujours les mêmes phrases. Cette forme se traite et est donc rarement définitive.

2.Type paranoïde : le tableau clinique est dominé principalement par les hallucinations auditives et les délires. Le sujet répond le plus souvent aux traitements antipsychotiques.

3.Type désorganisé : il se caractérise par des discours et des comportements désorganisés et un affect inapproprié. Ils ne doivent pas répondre aux critères du type catatonique.

4.Type résiduel : le patient présente une absence d'idées délirantes, d'hallucinations et de discours ou de comportements désorganisés ou catatoniques. Pourtant, il persiste des éléments de la maladie comme les symptômes négatifs.

5.Type indifférencié : dans cette catégorie, on trouve les patients atteints de la pathologie mais n'appartenant à aucune des classes préalablement décrites.

1.3 Bases neuroanatomiques et fonctionnelles de la schizophrénie.

1.3.1 Bases neuroanatomiques

La recherche d'anomalies anatomiques au niveau cérébral chez les patients schizophrènes a débuté à la fin du 20^e siècle. Les premiers travaux ont été réalisés sur des échantillons post-mortem de patients et de sujets sains mais n'ont pas

permis de révéler de différence significative tant la nature des lésions recherchées sont discrètes et subtiles. Ce n'est qu'avec les progrès de l'imagerie médicale par résonance magnétique (IRM) que des différences neuroanatomiques ont pu être établies. Ainsi, la plupart des études d'IRM s'accordent à démontrer chez les patients l'existence d'un élargissement des ventricules cérébraux dès l'apparition des premiers épisodes psychotiques (Hirayasu et al. 1999). Le cerveau des schizophrènes présente une réduction systématique du volume total caractérisé par une atrophie des régions amygdalo-hippocampiques (Shenton et al. 1992), préfrontales et en particulier, de sa substance blanche (Sullivan et al. 1998) et des substances blanche et grise du lobe temporal (Shenton et al. 1992). Par ailleurs, de forte variabilité ont été observées au niveau de certaines structures sous corticales en particulier des thalami, des ganglions de la base et du corps calleux (Figure 1). Cependant, ces modifications anatomiques observées chez le patient schizophrène font l'objet de controverses. En effet, les différences anatomiques sont très variables entre individus sains d'une part et entre individus schizophrènes d'autre part, et finalement entre les deux groupes. De plus, chaque patient présentant une palette de symptômes très différents, les recherches se sont donc orientées vers l'étude de modifications anatomiques communes.

Cette atrophie neuroanatomique pourrait trouver son origine au cours du développement cérébral postnatal. En effet, des études ont montré qu'au cours de la période de préadolescence et d'adolescence, il y a une augmentation de 12.4 % qui est normalement suivi d'une diminution de volumétrie des régions sous-corticales et des cortex frontaux, pariétaux et occipito-temporaux (Giedd et al. 1999; Sowell et al. 1999). Ces modifications se déroulent entre l'âge de 4 et 20 ans et correspondent aux vagues de productions synaptiques puis d'éliminations sélectives des synapses avec l'expérience et la maturation du cerveau. Des études portant sur des cohortes de patients schizophrènes adolescents démontrent des réductions dramatiques (4 fois plus importantes) des volumes des substances blanche et grise (Giedd et al. 1999; Rapoport et al. 1999).

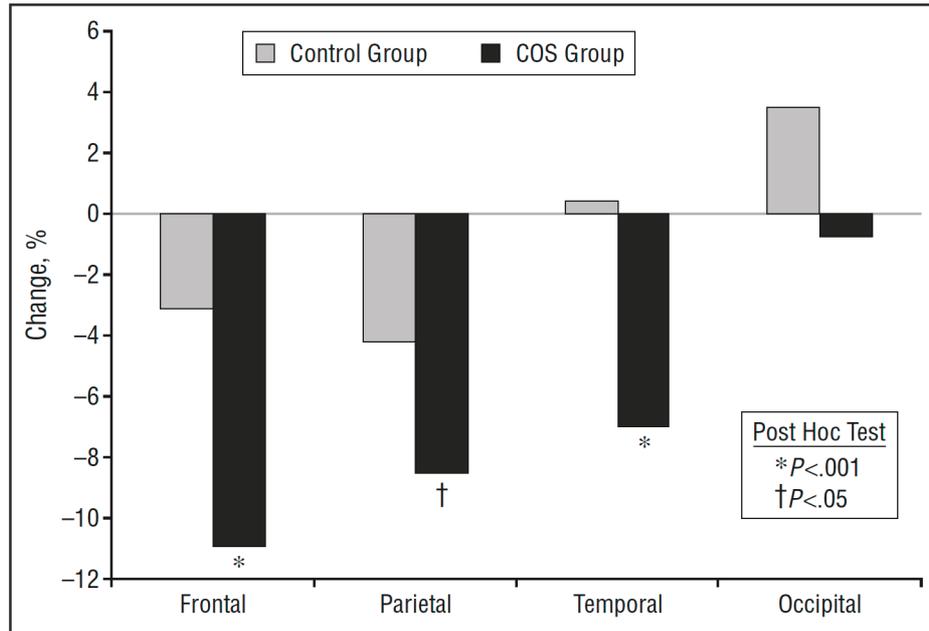


Figure 1: Représentation des changements de volumes de la substance grise dans différentes régions du cortex, au cours de l'adolescence. Ces mesures ont été effectuées par IRM sur des volontaires sains (âgés de 13 à 18 ans, $n = 34$) et sur des patients atteints de schizophrénie infantile ($n = 15$) (Rapoport et al. 1999).

1.3.2 Bases fonctionnelles.

A la fin des années 1990, une nouvelle application de l'IRM, l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) a vu le jour. Le but de cette technique est de détecter les régions du cerveau activées lors de tests cognitifs ou comportementaux. L'application de l'IRMf à l'étude du cerveau des patients schizophrènes a permis de mettre en évidence le rôle primordial du cortex préfrontal (PFC) et de l'hippocampe comme les structures majeures atteintes chez les patients schizophrènes. En effet, une hypoactivation de ces structures a été mesurée chez les patients schizophrènes par rapport aux volontaires sains, lors de tests de mémoire de travail, d'attention, de langage et de conceptualisation. Finalement, L'IRMf a permis de faire la corrélation entre les différentes classes de symptômes (positifs, négatifs et cognitifs) et les zones cérébrales activées correspondantes (Figure 2) (Goghari et al. 2010).

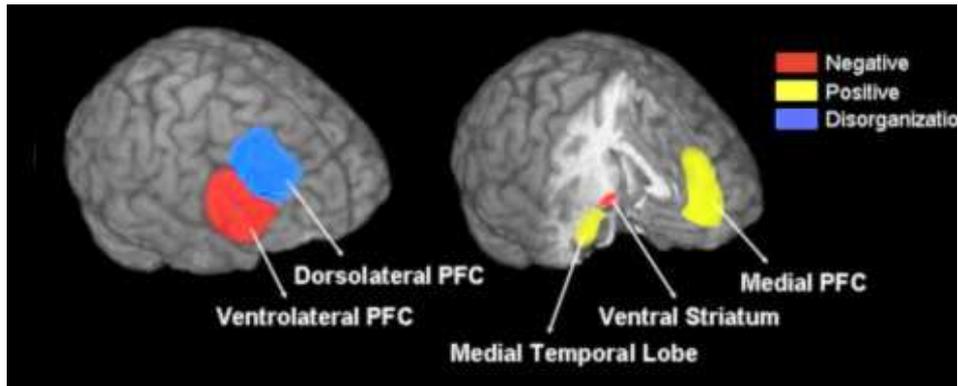


Figure 2: Représentation schématique des structures cérébrales associées aux différents symptômes rencontrés chez les schizophrènes. PFC = cortex préfrontal, Medial temporal lobe = amygdale, hippocampe et les cortex adjacents (Goghari et al. 2010).

En conclusion, la schizophrénie est une maladie psychiatrique, qui se développe à l'adolescence, dont l'étiologie est encore mal connue. Toutefois, il est clairement démontré que des facteurs génétiques sont impliqués dans la pathologie, associés à des facteurs environnementaux. La schizophrénie est caractérisée par une triade de symptômes, les symptômes positifs, négatifs et cognitifs. Finalement, deux structures du système nerveux central sont considérées comme ayant un rôle majeur, dans les altérations comportementales rencontrées chez les patients schizophrènes, **l'hippocampe** et le **cortex préfrontal**.

1.4 Hypothèse dopaminergique de la schizophrénie.

En 1952, Delay et Deniker mettent en évidence les propriétés antipsychotiques de la chlorpromazine (Delay et al. 1952). Dix plus tard, Carlsson montre que les antipsychotiques comme l'haloperidol et la chlorpromazine agissent sur le système dopaminergique en bloquant les récepteurs de ce neurotransmetteur. Ce sont sur ces bases qu'a été construite l'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie, selon laquelle cette pathologie résulte d'un dysfonctionnement et notamment, d'une hyperdopaminergie du système monoaminergique.

Dans ce chapitre, nous rappellerons des notions essentielles concernant le métabolisme de la dopamine ainsi que ses principales voies, ses récepteurs et finalement, les fonctions de la dopamine dans le système nerveux central et les liens entre système dopaminergique et schizophrénie.

1.4.1 La dopamine, métabolisme et projections dans le SNC.

Biosynthèse.

La dopamine fut identifiée comme neurotransmetteur dans le cerveau en 1959 par Arvid Carlsson (Carlsson 1959), elle appartient à la famille des catécholamines (Landry 2003). Les catécholamines sont constituées d'un noyau aromatique et d'un groupe aminé (Figure 3). Les catécholamines sont représentées par la dopamine mais aussi par l'adrénaline (Épinéphrine) et la noradrénaline (Norepinéphrine). L'adrénaline et la noradrénaline sont des neuromédiateurs dans le SNC, notamment impliquées dans le stress, les situations d'alerte ou de vigilance.

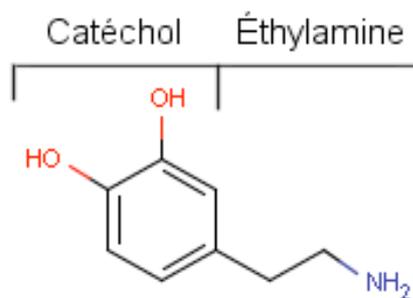


Figure 3: Structure de base d'une catécholamine. Cette structure est composée d'un noyau aromatique (catéchol) et d'un groupe aminé (Éthylamine).

La première étape de la synthèse de la dopamine est la transformation de l'acide aminé, l-tyrosine, en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase (TH) (Figure 4). Cette étape est cruciale pour la synthèse de DA car c'est le niveau d'activité de la TH qui limite la production de la DA. La L-DOPA subit ensuite une décarboxylation par la L-DOPA décarboxylase ce qui résulte en la formation de DA.

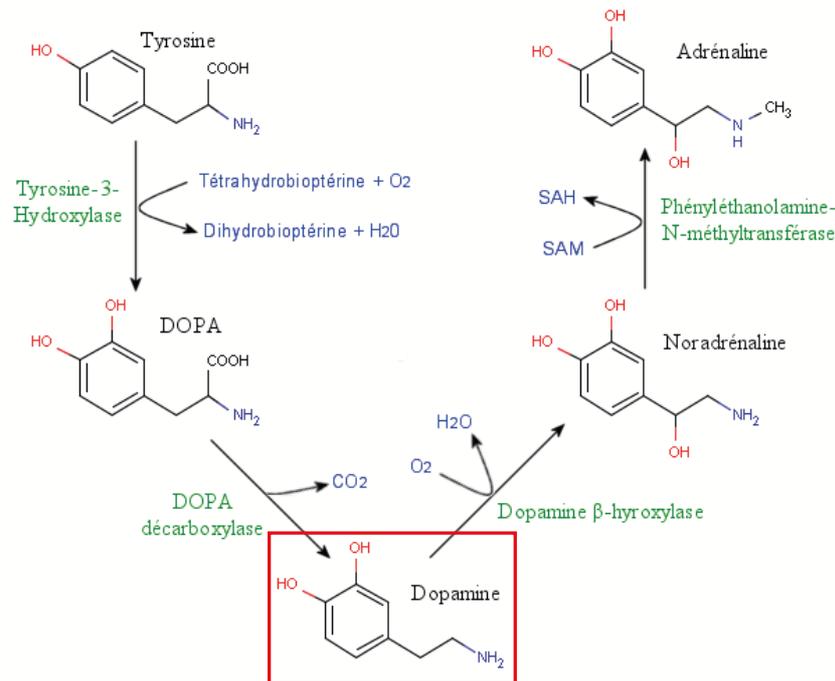


Figure 4: Voie de biosynthèse des catécholamines. Les enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse sont inscrites en vert. Les cofacteurs sont inscrits en bleu. SAM: S-adénosyl méthionine.

Finalement, la dopamine peut-être hydroxylée en noradrénaline par la dopamine- β -hydroxylase. Par la suite, la noradrénaline est méthylée en adrénaline par la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT), une enzyme utilisant la S-adénosyl méthionine (SAM) comme cofacteur.

Une fois libérée dans la fente synaptique, la DA se fixe à ces récepteurs, puis est recapturée dans le cytoplasme par son transporteur membranaire DAT pour être métabolisée par la suite. Les DAT sont exprimés par les neurones et par les astrocytes (Karakaya et al. 2007). Ils sont localisés au niveau des épines, des dendrites et du soma mais ne sont pas présents dans la zone active de la synapse. Les études de localisation subcellulaire de DAT en microscopie électronique suggèrent que ces transporteurs ne sont pas localisés au niveau des densités synaptiques mais sont restreints aux zones peri-synaptiques, ce qui implique que la dopamine diffuse depuis la synapse et va avoir une action volumique (Hersch et al. 1997; Hoffman et al. 1998). Les DAT sont les cibles des amphétamines et de la cocaïne.

Catabolisme.

Les catécholamines une fois recapturées sont métabolisées. La dégradation des catécholamines (Figure 5) fait intervenir deux enzymes : la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) cytoplasmique et la monoamine oxydase (MAO) localisée sur la membrane externe des mitochondries. La catéchol-O-méthyltransférase est spécifique des catécholamines, elle réalise une méthylation d'un des deux groupements hydroxyles du noyau catéchol. La monoamine oxydase, qui apparaît dans les voies de catabolisme de nombreux composés, catalyse une désamination oxydative.

L'action de la COMT sur l'adrénaline et la noradrénaline conduit respectivement à la métanéphrine (MN) et à la normétanéphrine (NMN). Ces deux métabolites subissent alors l'action de la MAO et sont transformés en acide vanillyl-mandélique (VMA). L'action des enzymes MAO et COMT sur la dopamine conduit à l'acide homovanilique (HVA).

Les deux enzymes du catabolisme de la dopamine sont présentes dans les neurones dopaminergiques et noradrénergiques du SNC. Il est intéressant de noter que ces deux enzymes sont également présentes dans les astrocytes (Youdim and Bakhle 2006; Tchivileva et al. 2009). En conséquence, les astrocytes ont la capacité de recapturer et de cataboliser la dopamine.

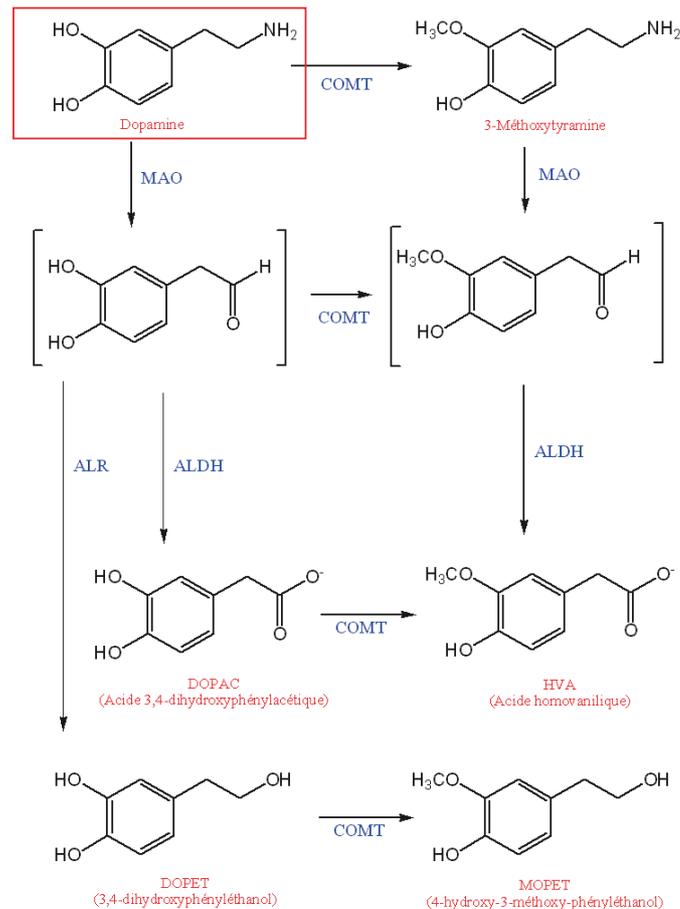


Figure 5 : Représentation de la voie de dégradation de la dopamine. Les enzymes dans cette voie sont inscrites en bleu. ALR : Aldéhyde réductase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase.

Voies dopaminergiques dans le SNC.

La dopamine dans le SNC est synthétisée, stockée, libérée par plusieurs groupes de neurones dopaminergiques centraux ayant des localisations anatomiques distinctes (Figure 6).

La voie nigro-striatale contient à elle seule 80 % des neurones dopaminergiques du SNC. Les corps cellulaires sont localisés dans la pars compacta de la substance noire. Cette voie dopaminergique se projette depuis le mésencéphale jusque dans le striatum constitué du noyau caudé et du putamen. Elle contrôle la motricité automatique. Un déficit dopaminergique à son niveau produit des troubles moteurs parkinsoniens.

La voie méso-corticolimbique dont les corps cellulaires sont localisés dans l'aire tegmentale ventrale du mésencéphale, se projette vers différentes structures limbiques (noyau accumbens, septum, tubercules olfactifs, amygdales, hippocampes, cortex préfrontal ainsi que d'autres régions corticales). Cette voie est impliquée dans les réactions comportementales liées à l'émotivité, à l'anxiété et dans différentes fonctions cognitives.

La voie tubéro-infundibulaire se projette sur une courte distance depuis l'hypothalamus vers l'éminence médiane. Par voie sanguine, cette voie régule en particulier la libération de prolactine par les cellules lactotropes de l'hypophyse.

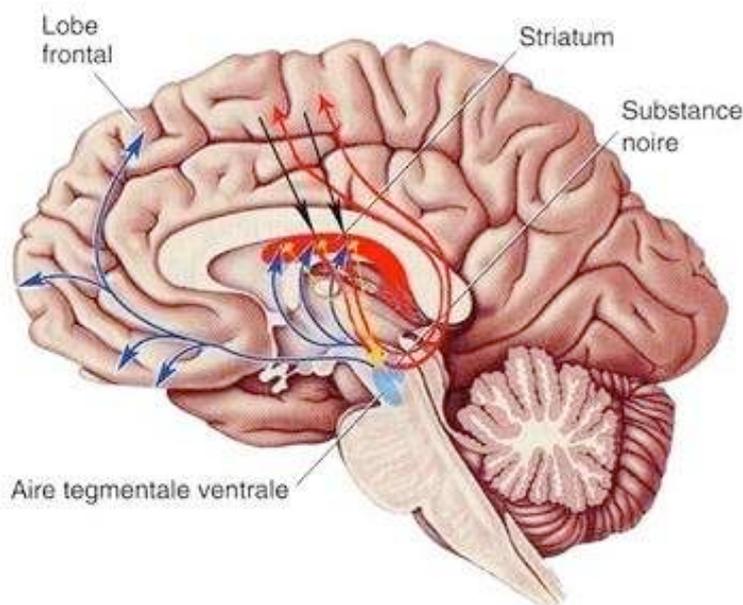


Figure 6 : Voies dopaminergiques cérébrales. En rouge est tracée la voie nigro-striatale, en bleu la voie méso-corticolimbique et en jaune la voie tubéro-infundibulaire.

1.4.2 Récepteurs de la dopamine et localisations cellulaires.

Classifications des récepteurs dopaminergiques.

Les récepteurs de la dopamine appartiennent à la classe des récepteurs métabotropiques à sept domaines transmembranaires et couplés aux protéines G. Si les segments transmembranaires sont bien conservés pour tous les récepteurs de la dopamine, les régions intra- et extra-cellulaires sont beaucoup plus variables (Civelli et al. 1993). La partie C-terminale des récepteurs est responsable de l'adressage des

récepteurs à la membrane et de leurs interactions avec les protéines d'échaffaudage. Cette partie C-terminale est également impliquée dans la formation d'hétérodimères ou d'homodimères (Lee and Liu 2004) (Figure 7). Les boucles extracellulaires E1 et E2 sont reliées par un pont disulfure. La disposition des hélices transmembranaires, l'une par rapport à l'autre, est légèrement modifiée par la liaison de la dopamine.

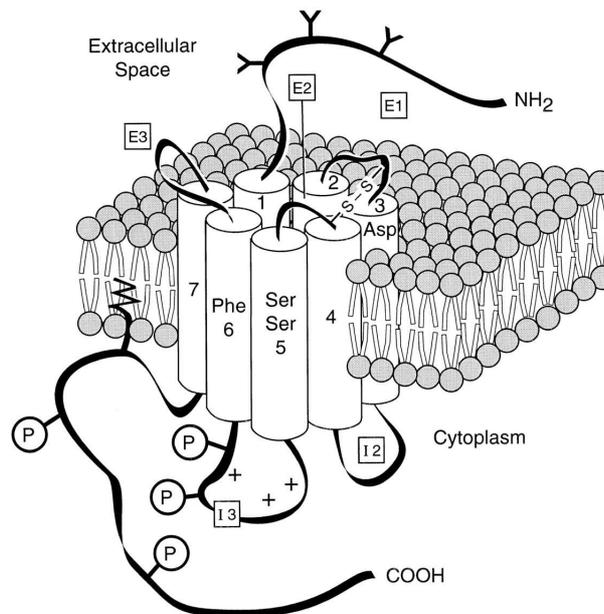


Figure 7 : Représentation schématique de la structure des récepteurs dopaminergiques. Les acides aminés impliqués dans la liaison avec la dopamine sont notés sur les hélices transmembranaires ainsi que les sites de phosphorylations (Missale et al. 1998)

Chez les Vertébrés, les récepteurs de la dopamine sont subdivisés en deux classes : les récepteurs D1 et les récepteurs D2. Ces classes ont été initialement définies par leur capacité à moduler l'activité de l'adénylyl cyclase (AC) et la production d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) dans les cellules (Kebabian and Calne 1979). Alors que la classe des récepteurs D1 stimule l'activité de l'adénylyl cyclase, celle des récepteurs D2 inhibe au contraire cette activité. Les récepteurs de ces deux classes ont ensuite été différenciés par leurs propriétés pharmacologiques puis clonés, ce qui a révélé l'existence d'autres types de récepteurs de la même famille (Sokoloff and Schwartz 1995; Missale et al. 1998). Ainsi chez les mammifères, cinq sous-types de récepteurs de la dopamine ont été identifiés. La classe des récepteurs D1 comporte deux sous-types : les récepteurs

D1A (ou D1) et D1B (ou D5) ; la classe des récepteurs D2 comprend trois sous-types : D2, D3 et D4. Ils sont codés par cinq gènes distincts mais présentent au sein d'un même groupe, un fort pourcentage d'homologie (Tableau 1).

	D1-like		D2-like		
	D1	D5	D2short:long	D3	D4
Amino acids	446 (human, rat)	477 (Human) 475 (rat)	414/443 (human) 415/444 (rat)	400 (human) 446 (rat)	387 (human, rat)
Homolgy (%) With D1 With D2	100 44	82 49	44 100	44 76	42 54
Localisation	caudate/putamen nucleus accumbens, olfactory tubercle, hypothalamus, thalamus, frontal cortex.	hippocampus, thalamus, striatum, cerebral cortex, (all low).	caudate/putamen, nucleus accumbens, olfactory tubercle, cerebral cortex (low).	nucleus accumbens, olfactory tubercle, island of calleja, putamen (low), cerebral cortex (low)	frontal cortex, midbrain amygdala hippocampus, hipothalamus, medulla (all low) retina
Protein G	Gs	Gs	Gi/o	Gi/o	Gi/o
Response	Adenylyl cyclase ↗	Adenylyl cyclase ↗	Adenylyl cyclase ↘	Adenylyl cyclase ↘	Adenylyl cyclase ↘
Organisation of amino acid sequence Putative third intracellular loop C-term tail	Short Long	Short Long	Long Short	Long Short	Long Short

Tableau 1 : Définition des sous-types de récepteurs dopaminergiques et leurs actions sur l'AC (Missale et al. 1998).

Les récepteurs D1 possèdent une longue extrémité C- terminale cytoplasmique et une troisième boucle cytoplasmique courte. A l'opposé, les récepteurs D2 ont une extrémité C-terminale cytoplasmique très courte et une troisième boucle cytoplasmique très longue. Ces deux régions interviennent dans un certain nombre de régulations de l'activité du récepteur, la plus importante étant son couplage aux protéines G. Ce couplage est d'ailleurs un autre critère de distinction des récepteurs de la dopamine. En effet, les récepteurs D1 sont associés aux protéines Gs alors que les récepteurs D2 sont couplés aux protéines Gi, modulant ainsi différemment les voies de signalisation intracellulaire (Callier et al. 2003).

L'augmentation de la production d'AMPc résultant de l'activation des récepteurs D1-like entraîne l'activation de la PKA (Protein Kinase A) qui phosphoryle de très nombreuses protéines, dont la protéine CREB, facteur de transcription et de la protéine DARPP-32 (Dopamine and cyclic AMP regulated phosphoprotein de 32kD). DARPP-32 est un inhibiteur de la protéine phosphatase 1 (PP1) qui a pour rôle de déphosphoryler les protéines préalablement phosphorylées par les protéines kinases, PKA en particulier (Figure 8). Ainsi la phosphorylation de DARPP-32 engendrée par la stimulation des récepteurs D1 agit comme un rétrocontrôle positif en retardant l'inactivation des autres protéines cellulaires, phosphorylées en réponse à l'activation dopaminergique.

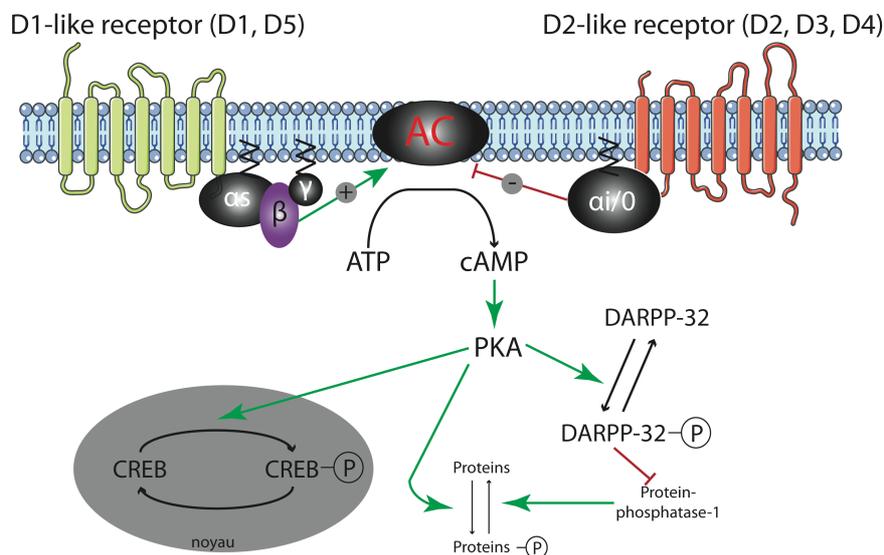


Figure 8 : voies de signalisation intracellulaire des récepteurs dopaminergiques. Les récepteurs de la dopamine D1 activent l'AC par l'intermédiaire de la protéine Gs ce qui entraîne une augmentation de l'AMPc ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de DARPP-32. *A contrario*, les récepteurs de la dopamine de type D2 inhibent l'AC et donc la formation d'AMPc, ce qui entraîne une déphosphorylation de DARPP-32 et l'activation de la PP1 (Girault and Greengard 2004).

Les voies de signalisation des récepteurs *D2-like* sont plus diversifiées que celles des récepteurs *D1-like*. Couplés à *Gi/o*, leurs activations diminuent l'activité de l'AC et le taux d'AMPc, et pourraient ainsi activer les canaux potassiques des neurones dopaminergiques de la substance noire et du striatum, entraînant leur hyperpolarisation .

Localisations cellulaires et subcellulaires des récepteurs de la dopamine.

Dans le cortex cérébral, les récepteurs D1 et D2 sont localisés sur les neurones post-synaptiques recevant des afférences dopaminergiques dans toutes les couches et majoritairement dans les couches V/VI (Vincent et al. 1993). Les récepteurs D1 ont été mis en évidence par microscopie électronique principalement au niveau des épines dendritiques de neurones pyramidaux dans le cortex préfrontal. Les récepteurs D2 sont également exprimés par les terminaisons des neurones dopaminergiques où ils agissent comme des autorécepteurs, diminuant ainsi la libération de dopamine (Nowak 1985). Les récepteurs D3 sont localisés dans les compartiments somatodendritiques et les boutons synaptiques des neurones dopaminergiques et non dopaminergiques dans le système mésolimbique dopaminergique (Stanwood et al. 2000). Quant aux récepteurs D4, ces récepteurs sont exprimés par les neurones pyramidaux et non pyramidaux dans les couches II/III du cortex cérébral. Dans la couche I, la distribution de D4 est exclusivement enrichie au niveau des dendrites apicales (Rivera et al. 2008). Des expériences de double-immunomarquages montrent que D4 est présent dans les interneurons GABAergiques calbindine-D28k-positifs et parvalbumine-positifs (Wedzony et al. 2000). Les techniques d'immunomarquages ont permis de mettre en évidence les récepteurs D5 sur la quasi totalité des neurones excitateurs et inhibiteurs dans le cortex préfrontal (PFC) du rat. La majorité des neurones excitateurs sont des neurones pyramidaux, où l'on trouve le récepteur D5 localisé au niveau somatique ainsi qu'au niveau dendritique en incluant les épines dendritiques (Oda et al.).

Néanmoins, la distribution des récepteurs de la dopamine n'est pas restreinte aux seuls neurones dans le système nerveux central (SNC). En effet, il a été établi que les cellules gliales et notamment les astrocytes en cultures expriment les ARNm des cinq sous-types de récepteurs (Miyazaki et al. 2004). Les cellules gliales seraient donc capables d'intégrer le signal dopaminergique. En effet, les récepteurs D2 ont été mis en évidence dans les astrocytes in situ par microscopie électronique au niveau du PFC des primates non humains (Khan et al. 2001). De plus, la protéine DARPP-32, très spécifique de la voie dopaminergique intracellulaire, est retrouvée

elle aussi dans les astrocytes du PFC du macaque (Glausier et al.). Finalement, les astrocytes, ne sont pas les seules cellules gliales exprimant DARPP-32. En effet, la présence de DARPP-32 a été révélée dans les tanyocytes de l'hypothalamus de rat et de singe par microscopie électronique (Meister et al. 1988).

1.4.3 Altérations des voies dopaminergiques dans la schizophrénie.

Evidence pharmacologique.

Au début des années 70, au cours de plusieurs études des psychoses ont été induites à l'aide d'amphétamines chez des patients non-schizophrènes (Angrist and Gershon 1970) (Bell 1973). Ces études ont clairement établi que l'administration prolongée de psychostimulant (amphétamine, méthamphétamine...) peut déclencher des états paranoïaques accompagnés par des hallucinations visuelles ou auditives, similaires à ceux trouvés chez les patients schizophrènes. Une importante propriété des psychostimulants est leur capacité à induire un phénomène de sensibilisation. En effet, l'exposition prolongée aux psychostimulants, notamment chez les personnes dépendantes, induit une réponse amplifiée au fur et à mesure du nombre de prises. Les patients ayant abusé des psychostimulants et qui ont présenté des psychoses induites restent vulnérables même lors de la prise de faibles doses de psychostimulants. Ces résultats indiquent ainsi que l'hyperactivité du système dopaminergique est capable de s'autoentretenir pendant une certaine période malgré l'arrêt des psychostimulants (Laruelle 2000). De plus, ces effets peuvent être antagonisés grâce à l'administration d'antagonistes des récepteurs D2. Les similarités entre ces patients et les patients schizophrènes en terme de vulnérabilité aux effets hallucinatoires des psychostimulants, ont conduit à la théorie selon laquelle la schizophrénie pourrait être associée à un mécanisme de sensibilisation endogène. Plusieurs études ont montré que cette sensibilisation est associée à une augmentation de la libération de la dopamine (Laruelle 2000). Ces résultats ont été confirmés par une étude d'imagerie cérébrale démontrant une induction de l'augmentation de la libération de dopamine par les amphétamines, supportant ainsi l'idée d'un mécanisme de sensibilisation endogène du système dopaminergique au niveau subcortical (Boileau et al. 2006). Par ailleurs, il a été montré que la prise de

psychostimulants, à des doses sans effets sur des volontaires sains, décuple les symptômes déjà présents chez les patients schizophrènes.

Depuis la découverte des propriétés antipsychotiques de la chlorpromazine en 1952, l'utilisation de ces molécules a profondément modifié l'évolution et le pronostic de la schizophrénie en réduisant les symptômes ainsi que les risques de rechute. Il est clairement démontré, notamment par des études d'imageries, que les antipsychotiques sont des antagonistes des récepteurs dopaminergiques de type D2 (Talbot and Laruelle 2002). Toutefois, les antipsychotiques de premières générations agissent principalement sur les symptômes positifs. La synthèse des antipsychotiques de seconde génération (clozapine, amisulpride) a permis d'améliorer la prise en charge des patients en améliorant partiellement les symptômes cognitifs. Cependant, cette amélioration de l'efficacité thérapeutique s'explique en partie par une action conjointe de ces molécules comme antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2 et des récepteurs sérotoninergiques (5HT2A). Cette synergie d'action augmente la libération et la concentration de dopamine au niveau du PFC (Gessa et al. 2000; Ichikawa et al. 2001) comme cela a été observé chez le rat par des techniques de microdialyse intracérébrale. Ainsi, l'effet bénéfique de l'administration d'antipsychotiques de seconde génération chez les patients résulterait d'une augmentation des niveaux de dopamine dans le PFC, permettant une amélioration des comportements cognitifs.

Etude post-mortem et imagerie cérébrale.

De nombreuses études sur des échantillons post-mortem ont été réalisées et ont permis de caractériser les niveaux de dopamine ainsi que l'expression de ses récepteurs dans différentes structures.

L'application des techniques de mesures de déplacements de radioligands comme le spiperone tritié a permis de mettre en évidence une augmentation du niveau d'occupation des récepteurs de la dopamine dans les régions subcorticales comme le noyau caudé (Owen et al. 1978) et accumbens (Mackay et al. 1982). Cette augmentation d'occupation des récepteurs résulte d'une augmentation des niveaux

de dopamine endogène. Ces études ont été confirmées par la mesure en HPLC de la dopamine dans ces différentes régions notamment dans l'amygdale et le noyau caudé chez les patients schizophrènes (Reynolds 1983). Au contraire, une diminution du taux de dopamine a été constatée au niveau du PFC. En effet, une corrélation a pu être mise en évidence entre le faible niveau des métabolites de la dopamine et les faibles performances cognitives (Goldman-Rakic et al. 2000). Par ailleurs, les patients schizophrènes présentent une diminution d'activité du cortex cingulaire antérieur, structure connectée au PFC, qui a été mesurée par tomographie par émission de positron (Dolan et al. 1995). L'injection d'agonistes dopaminergiques a pour résultante une augmentation de l'activité du cortex cingulaire antérieur qui s'accompagne d'une amélioration des fonctions cognitives.

Par ailleurs, ces études ont permis de mettre en évidence une augmentation de la densité et de la sensibilité des récepteurs D2 dans le striatum (Seeman et al. 2006). Cette augmentation peut avoir pour origine l'administration chronique d'antipsychotiques comme cela a été démontré en 1977 (Burt et al. 1977). Une augmentation des récepteurs dopaminergiques de type D1 a également été mesurée au niveau du PFC et pourrait avoir pour origine la mise en place d'un mécanisme de compensation à cause de l'hypodopaminergie consécutive (Abi-Dargham et al. 2002). Concernant les récepteurs dopaminergiques de type D3 et D4, aucune modification du nombre de récepteurs n'a été mesurée et ce, quelle que soit la structure observée.

En conclusion, l'hypothèse dopaminergique repose sur une ambiguïté. Tout d'abord, les régions sous-corticales sont le siège d'une hyperdopaminergie qui a pu être révélée grâce aux méthodes d'imagerie cérébrales ainsi que les connaissances accumulées concernant les antipsychotiques et leurs actions antagonistes des récepteurs dopaminergiques de type D2. De plus, cette hyperdopaminergie est responsable en partie des symptômes positifs. Par opposition, une hypodopaminergie au niveau du cortex préfrontal a été observée et elle est associée à une augmentation de la densité des récepteurs dopaminergiques de type D1. Cette hypodopaminergie serait responsable des troubles cognitifs rencontrés, notamment

chez les patients schizophrènes. Toutefois, la seule hypothèse dopaminergique est devenue de moins en moins crédible suite à la synthèse des antipsychotiques de deuxième génération. En effet, ces antipsychotiques n'agissent plus uniquement sur les récepteurs dopaminergiques mais aussi sur les récepteurs sérotoninergiques. Par ailleurs, la découverte des effets psychotiques de molécules comme la phencyclidine qui touche le système glutamatergique a profondément modifié notre vision de la physiopathologie de la schizophrénie. La phencyclidine est capable d'induire chez un patient sain des symptômes équivalents à ceux rencontrés chez les patients schizophrènes. Cette molécule est un antagoniste d'un sous-type de récepteur au glutamate, le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), conduisant ainsi l'émergence d'une nouvelle hypothèse, l'hypothèse glutamatergique.

1.5 Hypothèse glutamatergique de la schizophrénie.

La kétamine et le phencyclidine (PCP) sont deux anesthésiques utilisés depuis plus de 50 ans, leur principal effet secondaire est l'induction d'une psychose, dont les symptômes sont très difficiles à différencier de ceux des patients schizophrènes (Luby et al. 1959). Il est intéressant de noter que ces effets secondaires sont très majoritairement rencontrés chez les adultes de plus de 16 ans (Reich and Silvey 1989). En effet, les enfants sont peu enclins à développer ces troubles, consécutivement à l'administration de kétamine, ce qui conforte la théorie développementale de la schizophrénie (voir chapitre 1.3.1). Suite à l'émergence de la pharmacologie des récepteurs NMDA, Javitt et Zukin (Javitt and Zukin 1991) proposèrent que les effets psychomimétiques de la kétamine et du PCP soient dus à un blocage de ces récepteurs. Ces deux molécules sont des antagonistes non compétitifs du récepteur NMDA ; elles agissent en se fixant à l'intérieur du canal lorsque celui est ouvert. Il fût démontré par la suite, que l'administration de faibles doses de kétamine à des volontaires sains, déclenche des symptômes négatifs et cognitifs et une partie des symptômes positifs comme les hallucinations que l'on retrouve chez les patients schizophrènes (Krystal et al. 1994). De plus, les volontaires sains ayant reçu une faible dose de kétamine ont développé des troubles de la mémoire de travail comme chez les patients schizophrènes, suggérant ainsi

que les récepteurs NMDA jouent un rôle primordial dans les altérations des fonctions cognitives rencontrées chez les schizophrènes (Adler et al. 1999).

D'autres arguments sont venus étayer l'hypothèse glutamatergique et le rôle central du récepteur NMDA dans la schizophrénie. Le glutamate carboxy peptidase (GCP II) est une métalloenzyme qui catalyse l'hydrolyse d'un peptide, le N-acetylaspartylglutamate (NAAG) en glutamate et N-acetylaspartate (Mesters et al. 2006). Or, le NAAG est un antagoniste réversible du site glycine des récepteurs NMDA (Bergeron et al. 2005). Des études post-mortem d'échantillons de cerveau de patients schizophrènes, ont clairement démontré que les niveaux de GCPII sont diminués dans les cortex frontal et temporal ainsi que dans l'hippocampe (Tsai et al. 1995). Une des premières conséquences de cette réduction de GCPII est l'augmentation du NAAG qui n'est plus hydrolysé et deuxièmement, une diminution des niveaux de glutamate (Tsai et al. 1995). La baisse de GCPII participerait ainsi activement à l'hypofonction du récepteur NMDA.

1.5.1 Le récepteur NMDA.

Le glutamate, forme ionisée de l'acide glutamique, est le principal neuromédiateur excitateur du SNC. Le glutamate agit sur deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques ou canaux ioniques et les récepteurs métabotropiques (Dingledine et al. 1999)(Pin and Acher 2002). Les récepteurs ionotropiques ont été distingués pharmacologiquement sur la base de leur sensibilité pour différents agonistes. On répertorie les récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionic acid (AMPA), les récepteurs Kaïnate et les récepteurs (NMDA). Les récepteurs ionotropiques assurent la transmission synaptique dite rapide. La liaison du ligand sur le récepteur induit le passage sélectif d'ions (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ou Cl^-) en fonction du gradient électrochimique. Par opposition, les récepteurs métabotropiques sont impliqués dans la transmission synaptique dite lente. Les récepteurs métabotropiques mettent en jeu des voies intracellulaires de signalisation impliquant divers types de second messenger comme la voie phospholipase C (PLC) / Inositol triphosphate (IP3).

Structure.

Le récepteur NMDA natif est un hétérodimère formé le plus souvent de l'association de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités NR2 (Martineau et al. 2006). Les sous-unités NR1, NR2 et NR3 présentent une structure de base commune. Le récepteur NMDA est constitué d'un domaine N-terminal extracellulaire, de trois domaines transmembranaires (M1, M3, M4) et d'un domaine M2 formant une boucle réentrantante qui constitue le canal ionique et finalement d'un domaine C-terminal cytoplasmique (Figure 9).

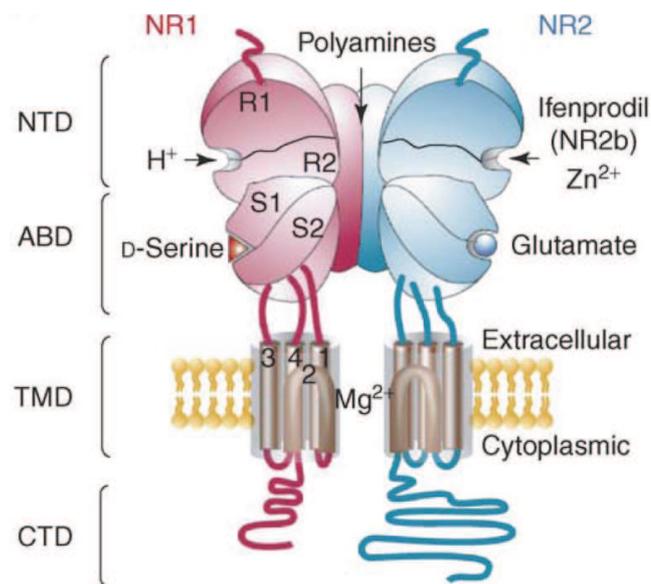


Figure 9 : Structure du récepteur NMDA. Représentation schématique de la structure des sous-unités présentant un domaine C-terminal (CTD), plusieurs domaines transmembranaires (TMD), un domaine de liaison à l'agoniste ou co-agoniste (ABD) et finalement un domaine N-terminal (NTD) (Martineau et al. 2006).

Le domaine C-terminal est le site de nombreuses phosphorylations par différentes kinases et est responsable des interactions entre le récepteur NMDA et ses protéines d'échafaudage et d'ancrage comme PSD95 (Post Synaptic Density 95) ou SAP90 (Synapse Associated Protein 90) (O'Brien et al. 1998). Le domaine N-terminal contient quant à lui, les deux structures globulaires S1 et S2 constituant le site de liaison de l'agoniste ainsi que deux autres structures R1 et R2 possédant des sites de liaisons pour les protons, les polyamines et le zinc qui modulent l'activité du récepteur (Martineau et al. 2006). Finalement, la sous-unité NR1 contient le site de

liaison au co-agoniste, D-sérine ou glycine et la sous-unité NR2 le site de liaison au glutamate.

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs canaux perméables aux ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ (MacDermott et al. 1986). Par opposition, le canal présente une très faible perméabilité aux ions Mg²⁺, responsable d'une inhibition voltage dépendante (Mayer et al. 1984). En effet, lorsque le potentiel de membrane est inférieur à -50 mV, l'ion Mg²⁺ bloque le canal, empêchant tout flux ionique. Les ions Mg²⁺ sont expulsés hors du canal, consécutivement à une dépolarisation de la membrane. Par conséquent, on constate une augmentation de l'amplitude du courant entre -60 et -20 mV alors qu'elle devrait diminuer puisque l'on se rapproche du potentiel d'inversion des ions (Ca²⁺, K⁺ et Na⁺). Cette activation du récepteur NMDA à la suite d'une dépolarisation a conduit à le considérer comme un détecteur de coïncidences.

Les récepteurs NMDA possèdent une propriété biophysique remarquable. L'activation de ces récepteurs requiert la liaison concomitante du glutamate (ou agoniste) et la liaison d'un coagoniste. On doit la notion de coagoniste à la découverte par les groupes de Johnson et Ascher d'une part et d'autre part de Kleckner et Dingledine, que la glycine potentialise les effets du glutamate sur l'amplitude des courants NMDA (Johnson and Ascher 1987; Kleckner and Dingledine 1988). En l'absence de glycine, le coagoniste, aucun courant NMDA n'est enregistré. Depuis les années 2000, il a été montré que la D-sérine peut jouer ce rôle originellement attribué à la glycine (Mothet et al. 2000; Panatier et al. 2006).

Sous-unités.

Trois grandes familles de sous-unités des récepteurs NMDA ont été identifiées: NR1, NR2 et NR3. La sous-unité NR1 a été la première à avoir été clonée (Moriyoshi et al. 1991). Elle est ubiquitaire et nécessaire pour la formation d'un récepteur fonctionnel. Codée par un unique gène, elle est constituée de 22 exons et de 21 introns avec trois sites d'épissage alternatif qui vont générer huit isoformes fonctionnelles. Les modifications au niveau de ces trois sites impliquent l'insertion ou la délétion de trois cassettes : une cassette N-terminale, N1 sur l'exon 5 et deux cassettes C-terminale C1 sur l'exon 21, et C2/C2' sur l'exon 22 (Figure 10). Au cours

du développement et à l'âge adulte, il existe une expression régionalisée de ces isoformes NR1 (Laurie et al. 1995).

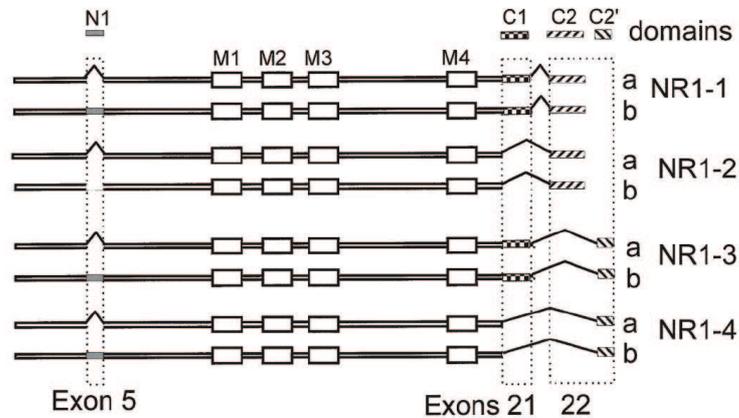


Figure 10 : Variant d'épissage de la sous-unité NR1. Structure du gène de la sous-unité NR1 et des variants issus de l'épissage alternatif des exons 5, 21 et 22 (Dingledine et al. 1999).

Les sous-unités NR2 du récepteur NMDA sont codées par quatre gènes synthétisant les sous-unités NR2A, NR2B, NR2C et NR2D (Ikeda et al. 1992; Kutsuwada et al. 1992; Monyer et al. 1992; Ishii et al. 1993). Elles sont exprimées différemment suivant le stade de développement et suivant la structure cérébrale concernée. En effet, NR2B et NR2D sont exprimées dès le stade embryonnaire alors que NR2A et NR2C sont exprimées uniquement après la naissance. Au stade adulte, NR2A est fortement exprimée dans de nombreuses régions cérébrales du rongeur, notamment dans les cortex cérébral et cérébelleux, ainsi que dans l'hippocampe. NR2B est distribuée de manière ubiquitaire alors que NR2C est essentiellement retrouvée dans les cellules granulaires du cervelet. Finalement, l'expression de NR2D est confinée au cortex, thalamus, tronc cérébral et au bulbe olfactif (Monyer et al. 1994; Watanabe et al. 1994; Watanabe et al. 1994; Wenzel et al. 1996).

Finalement, les sous-unités NR3A (Sucher et al. 1995) et NR3B (Nishi et al. 2001) sont les plus récentes à avoir été clonées. La sous-unité est exprimée précocement (E15) et jouerait ainsi un rôle important au cours du développement car elle est faiblement, voir indétectable dans le système nerveux à l'âge adulte, à l'exception du bulbe olfactif. L'expression de NR3B est restreinte aux motoneurones

du tronc cérébral et de la moelle épinière. La sous-unité NR3 peut s'assembler à NR1 pour former un récepteur glycinergique excitateur (Chatterton et al. 2002), insensible au magnésium et au glutamate et potentialisé par le zinc ou la glycine (Madry et al. 2008).

Rôles physiologiques à la synapse du récepteur NMDA.

Du fait de leurs fortes expressions et de leurs distributions ubiquitaires d'une part et de leur perméation aux ions calcium d'autre part, il n'est pas étonnant de retrouver les récepteurs NMDA dans de nombreux processus physiologiques comme la transmission et la plasticité synaptique et la synaptogenèse. Une dérégulation de l'activité ou de l'expression de ces récepteurs est également responsable de processus physiopathologiques comme l'excitotoxicité (Hardingham et al. 2002). Dans ce chapitre, je me limiterai volontairement à leurs rôles dans la plasticité synaptique à long-terme.

La plasticité synaptique à long terme correspond à une modification persistante de la force de la transmission synaptique. Deux formes de plasticité synaptique à long terme de type Hebbienne ont été décrites dans le SNC : la potentialisation à long terme (LTP, long term potentiation)(Malenka and Bear 2004) et la dépression à long terme (LTD, long term depression) (Collingridge et al. 2010). La LTP et la LTD constituent les bases cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire ; elles sont impliquées dans d'autres phénomènes comme l'addiction (Kasanetz et al. 2010). La LTP et la LTD dépendant des récepteurs NMDA sont les formes de plasticité les plus répandues dans le SNC. Toutefois, il existe d'autres formes de plasticité indépendantes des récepteurs NMDA.

La LTP a été mise en évidence pour la première fois en 1973 par Bliss et Lomo dans l'hippocampe (Bliss and Lomo 1973). De manière générale, une augmentation persistante de la taille des réponses synaptiques peut être observée au niveau des synapses glutamatergiques à la suite d'une stimulation à très haute fréquence (3x100Hz) des fibres nerveuses ou en réponse à une stimulation afférente combinée à une dépolarisation expérimentale du neurone postsynaptique, protocole connu sous le terme de pairing (Gustafsson et al. 1987). C'est le cas dans la région CA1 de l'hippocampe où la plasticité synaptique est la plus étudiée. L'implication du

récepteur NMDA dans l'induction de la LTP a été révélée par l'utilisation d'antagonistes spécifiques de ces récepteurs, dont le d-2-amino-5-phosphonovalerate (AP5 ou APV, Figure 11). En effet, l'application de ces antagonistes empêche l'induction de la LTP sans avoir aucun effet sur les potentiels post-synaptiques excitateurs évoqués à faible fréquence, ni sur les réponses potentialisées après induction de la LTP (Collingridge et al. 1983). Comment l'activation de récepteurs NMDA peut-elle conduire à la LTP? C'est précisément le flux entrant de Ca^{2+} , au travers de ces récepteurs, qui est responsable de l'induction de la LTP. En effet, tamponner la concentration de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique par le BAPTA bloquait l'induction de la LTP (Lynch et al. 1983) alors qu'à l'inverse, la photolyse UV de Ca^{2+} encagé induisait la LTP (Malenka et al. 1988).

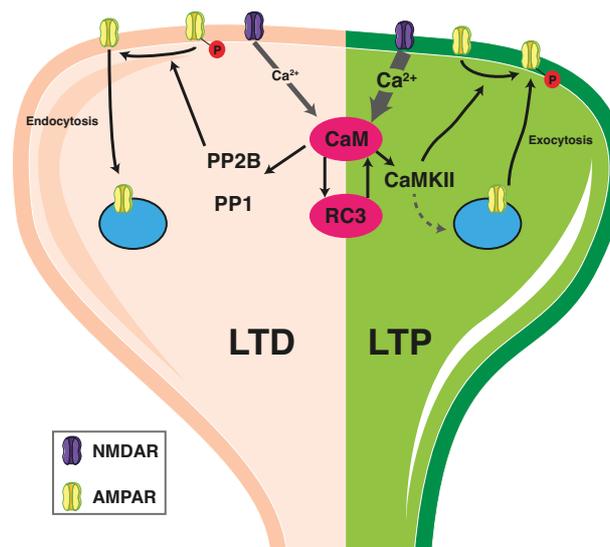


Figure 11 : Modèle d'induction de la LTD et de la LTP. Une entrée de calcium modérée et prolongée induit l'activation de phosphatases comme la PP1 ce qui entraîne une internalisation et une déphosphorylation des récepteurs AMPA synaptique, ce qui a pour conséquences une LTD. Par opposition, une entrée rapide de calcium induit l'activation de la CaMKII qui phosphoryle les récepteurs AMPA, et entraîne une augmentation de nombre de récepteur présent à la membrane.

L'étude des cascades intracellulaires mises en jeu lors de l'induction de la LTP a permis de mettre en évidence le rôle central de différentes kinases, parmi lesquelles la calcium-calmoduline (CaM) kinase II (Lledo et al. 1995; Lisman et al. 2002). D'autres kinases pourraient être impliquées à différents titres comme la PKA (Yasuda

et al. 2003), la protéine kinase C (PKC) (Hu et al. 1987; Malinow et al. 1989), les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la tyrosine kinase Src (Malenka and Bear 2004) .

Si le mécanisme impliqué dans l'induction de la LTP dépendant des récepteurs NMDA a été rapidement identifié, ceux responsables de l'expression de ce phénomène sont restés longtemps un sujet de controverse. Un consensus a cependant émergé au cours des dernières années, expliquant l'augmentation persistante de la force synaptique par une insertion de récepteurs AMPA à la synapse (Nicoll 2003). A ce mécanisme s'ajouterait une augmentation de la conductance de ces mêmes récepteurs AMPA due à la phosphorylation des sous-unités GluR1 (Benke et al. 1998; Lee et al. 2000).

La LTD est le phénomène inverse de la LTP : il correspond à une diminution persistante de la force de la transmission synaptique. La LTD la plus étudiée et la plus répandue est sous-tendue par l'activation des récepteurs NMDA (Mulkey and Malenka 1992). Inversement à la LTP, requérant une activation à haute fréquence des afférences synaptiques (3x100Hz), la LTD est induite par des protocoles de stimulation à faible fréquence : 1Hz pendant 15 minutes. La LTD dépendant des récepteurs NMDA dépend de l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique puisqu'elle peut être induite par photolyse de Ca^{2+} encagé (Yang et al. 1999), et inhibée par un chélateur de ces ions comme le BAPTA (Mulkey and Malenka 1992).

L'augmentation de calcium intracellulaire consécutivement à l'activation des récepteurs NMDA semble donc responsable de l'induction de la LTP et de la LTD, deux mécanismes synaptiques opposés. Comment un même signal déclencheur peut-il induire deux processus opposés ? Tandis que la LTP est sous-tendue par une augmentation rapide de Ca^{2+} intracellulaire (Malenka and Bear 2004), l'augmentation plus faible et prolongée de ce second messenger induit une LTD (Ismailov et al. 2004). La différence entre l'induction de la LTP et la LTD pourrait s'expliquer par la différence d'affinité de la CaMKII et de la calcineurine pour le Ca^{2+} , et d'une régulation négative entre ces deux voies de signalisation. La calcineurine, ayant une affinité pour le Ca^{2+} plus importante que celle de la CaMKII, celle-ci sera

activée pour de faibles augmentations de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, conduisant à la mise en place d'une LTD, sans qu'il y ait LTP par absence de stimulation de la voie CaMKII. En revanche, l'activation de la CaMKII lors d'une forte entrée de Ca^{2+} conduira à la mise en place d'une LTP sans qu'il y ait LTD, à cause de l'effet inhibiteur exercé par la voie CaMKII sur la voie des phosphatases (Lisman et al. 2002). Il apparaît donc que la plasticité synaptique requiert une balance délicate de l'activité des protéines kinases et des protéines phosphatases (Xia and Storm 2005). D'autre part, l'induction de cette LTD dépendrait également de l'activation de certaines kinases comme le glycogène synthétase kinase 3 (GSK3) (Peineau et al. 2008).

Contrairement à la LTP, la LTD est associée à une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la synapse (Luscher et al. 2000) et à une déphosphorylation des récepteurs AMPA (Lee et al. 2000), responsable d'une diminution de leur probabilité d'ouverture.

Des travaux réalisés dans l'hippocampe et le cortex ont suggéré que la direction de la plasticité synaptique à long-terme pourrait dépendre du sous-type de récepteurs NMDA activés (Liu et al. 2004; Massey et al. 2004). Dans le cortex, une étude a suggéré que la LTP dépendrait de l'activation des récepteurs NMDA constitués de la sous-unité NR2A, alors que la LTD serait sous-tendue par l'activation des récepteurs extrasynaptiques composés de la sous-unité NR2B (Massey et al. 2004). Dans l'hippocampe, alors que des récepteurs constitués de la sous-unité NR2B sont également présents à la synapse, il a été mis en évidence que l'induction de la LTP dépendrait des seuls récepteurs contenant la sous-unité NR2A alors que l'induction de la LTD nécessiterait la sous-unité NR2B (Liu et al. 2004). L'implication de la sous-unité NR2B dans la LTD reste encore controversée puisqu'une étude récente a révélé que dans l'hippocampe, les récepteurs NMDA formés de NR2B n'étaient pas impliqués dans la LTD alors qu'ils participaient à la transmission synaptique (Morishita et al. 2007).

Comme cela a déjà été abordé précédemment, la liaison d'un co-agoniste sur le site glycine est nécessaire pour l'activation des récepteurs NMDA. Cela signifie que tous les phénomènes sous-tendus par ces récepteurs, et en particulier la plasticité

synaptique, dépendent de la présence de ce co-agoniste. Bien que la glycine ait été identifiée très tôt comme le co-agoniste endogène des récepteurs NMDA, des données accumulées au cours de ces dix dernières années indiquent qu'un autre acide aminé pourrait être impliqué dans différentes structures du cerveau. Il s'agit de la D-sérine (Mothet et al. 2000; Panatier et al. 2006), connue depuis longtemps pour mimer l'effet de la glycine sur le récepteur NMDA.

1.6 Hypothèse GABAergique

Aux altérations des systèmes dopaminergiques et glutamatergiques, s'ajoutent d'autres altérations neurochimiques dans le cerveau des patients schizophrènes, notamment au niveau du principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

Le GABA est issu d'une décarboxylation de l'acide glutamique par l'acide glutamique décarboxylase (GAD), dont il existe deux formes, GAD-65 et GAD-67, et est catabolisé par la GABA transaminase (GABAT). Une fois libéré dans la fente synaptique, le GABA se fixe sur deux grandes familles de récepteurs, ionotropiques perméables aux ions Cl^- (GABA-A) et métabotropiques (GABA-B) couplés à une protéine G (G_i), inhibitrice de l'adenylyl cyclase. Finalement, le GABA est récapturé par l'intermédiaire d'une famille de transporteurs membranaires, dont 4 types ont été identifiés GAT-1 à GAT-4.

Chez les primates non-humains, l'activité des neurones GABAergiques dans le cortex préfrontal dorso-latéral est essentiel au fonctionnement normal de la mémoire de travail (Sawaguchi et al. 1989; Rao et al. 2000), suggérant qu'une altération de la transmission GABAergique peut contribuer aux déficits de ce type de mémoire rencontrés chez les schizophrènes.

Chez les patients schizophrènes, plusieurs altérations de la voie GABAergique ont été constatées. Tout d'abord, les niveaux d'expression des ARN messagers de GAD-67 sont diminués (Lewis et al. 2005). En second lieu, les ARNm du transporteur membranaire du GABA, GAT-1, présentent eux aussi, un niveau d'expression plus faible (Volk et al. 2001). Les techniques d'immunofluorescence ont permis de confirmer la diminution protéique de GAT-1 sur les neurones en chandelier du PFC

(Woo et al. 1998). Ces résultats suggèrent que la synthèse et la recapture de GABA sont réduites dans le PFC des patients schizophrènes.

Par ailleurs, un mécanisme de compensation s'établit, puisque en parallèle, une augmentation de l'immunoréactivité des récepteurs GABA-A a été mesurée au niveau du segment initial des axones des neurones pyramidaux (Volk et al. 2002).

Ces altérations de la voie GABAergique dans le PFC sont très spécifiques de la schizophrénie pour n'être pas retrouvées dans d'autres pathologies psychiatriques (Hashimoto et al. 2003). Ces altérations du métabolisme des neurones GABAergiques conduisent à une diminution du tonus inhibiteur intracortical au niveau des interneurons et à une diminution de l'activité GABA dans le mésencéphale. Il en résulte une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques dans le mésencéphale se projetant sur le striatum (Lewis and Gonzalez-Burgos 2006). Une étude récente a montré que l'inactivation chez la souris de l'expression de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA, présents sur les interneurons GABAergiques du système cortico-limbique provoque des déficits sociaux et cognitifs rencontrés chez les patients schizophrènes (Belforte et al. 2010). Cette étude est remarquable car elle présente le récepteur NMDA comme cause primaire de la schizophrénie d'une part, et d'autre part, elle réconcilie les hypothèses dopaminergique, glutamatergique et GABAergique.

1.7 Génétique et schizophrénie.

La schizophrénie est une maladie multifactorielle, des facteurs d'héritabilités ont pu être démontrés notamment du fait du risque accru au sein d'une même famille. Ces facteurs ont stimulé la recherche et l'identification des gènes impliqués, avec pour résultante l'émergence de plusieurs liens génétiques.

Un des premiers gènes identifiés fut le dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) qui produit la protéine dysbindine ; ce gène est localisé sur le chromosome 6 (voir figure 12). La dysbindine est très largement distribuée dans le cerveau et a été détectée aussi bien en pré- qu'en post-synaptique, au niveau des axones et de leurs terminaisons ainsi qu'au niveau des extrémités synaptiques des fibres myélinisées.

dans l'hippocampe et le cervelet (Benson et al. 2001). Un déficit en dysbindin modifie la taille des vésicules présynaptiques ainsi que la probabilité de libération des neurotransmetteurs (Chen et al. 2008; Dickman and Davis 2009). Elle est également impliquée dans le trafic, l'ancrage des récepteurs NMDA et GABA et aussi moduler l'activité du récepteur NMDA par une voie impliquant la NO-synthase (Straub et al. 2002). Une altération de l'expression de la protéine dysbindine est observée chez les patients schizophrènes, ce qui pourrait expliquer les déficits de transmission synaptique, notamment par l'hypofonctionnalité associée aux récepteurs NMDA.

La neuréguline 1 (NRG-1) a été identifiée comme gène candidat grâce une cartographie très fine des loci. Le gène de cette protéine est localisé sur le chromosome 8 et un lien génétique comme facteur de risque pour la schizophrénie a pu être établi (Stefansson et al. 2002; Stefansson et al. 2003). NRG-1 est une protéine de la voie de signalisation du récepteur ErbB4 impliquée dans la synaptogenèse et la migration neuronale (Ghashghaei et al. 2006; Li et al. 2007). L'activation d'ErbB4 conduit à phosphoryler le récepteur NMDA (Li et al. 2007) et donc à augmenter son activité. L'invalidation de l'expression de la voie de signalisation NRG-1/ErbB4 chez des souris Knock out ou par ARN interférents conduit à une perte d'expression des récepteurs NMDA et à une réduction de la taille et du nombre des épines dendritiques dans l'hippocampe (Li et al., 2007, Neuron). Cette dérégulation des récepteurs NMDA chez les animaux NRG-1^{-/-} peut s'expliquer en partie par le fait que ErbB4 interagit avec PSD-95 (post synaptic density 95), une protéine d'échafaudage des récepteurs NMDA (Garcia et al. 2000). De plus, NRG-1 possède un fragment c-terminal capable de se transloquer au niveau du noyau et d'interagir avec des facteurs de transcription, augmentant ainsi l'expression de certains gènes dont PSD-95. Le rôle de la NRG-1 dans la schizophrénie est toutefois controversé puisqu'une étude en 2006 sur des échantillons post-mortem humains a montré que l'expression de NRG-1 est augmentée chez les patients schizophrènes dans le cortex préfrontal (Hahn et al. 2006). Cette augmentation de l'activation NRG-1/ErbB4 a pour conséquence une hypofonction du récepteur NMDA. Bien que ces résultats soient cohérents avec l'hypothèse glutamatergique, ils contredisent les observations faites chez le rongeur.

La D-amino-acid-oxydase (DAAO), localisée sur le chromosome 12 est une protéine qui intervient dans le catabolisme de la D-sérine, potentiel co-agoniste du récepteur NMDA. Son activateur, la G72 aussi appelé D-amino acid oxydase activator (DAOA) est indiqué comme facteur de risque (Chumakov et al. 2002; Schumacher et al. 2004; Detera-Wadleigh and McMahon 2006). Une augmentation de l'activité de la DAAO associée à une augmentation des ARN messagers, a été retrouvée chez les patients schizophrènes. Cette augmentation a pour conséquence une diminution des taux de D-sérine retrouvés chez ces mêmes patients. Par ailleurs, une inactivation du gène de la DAAO chez la souris entraîne une sensibilité plus faible à la phencyclidine ou à d'autres antagonistes du récepteur NMDA (Verrall et al. 2010), , comme le MK801 ou la kétamine.

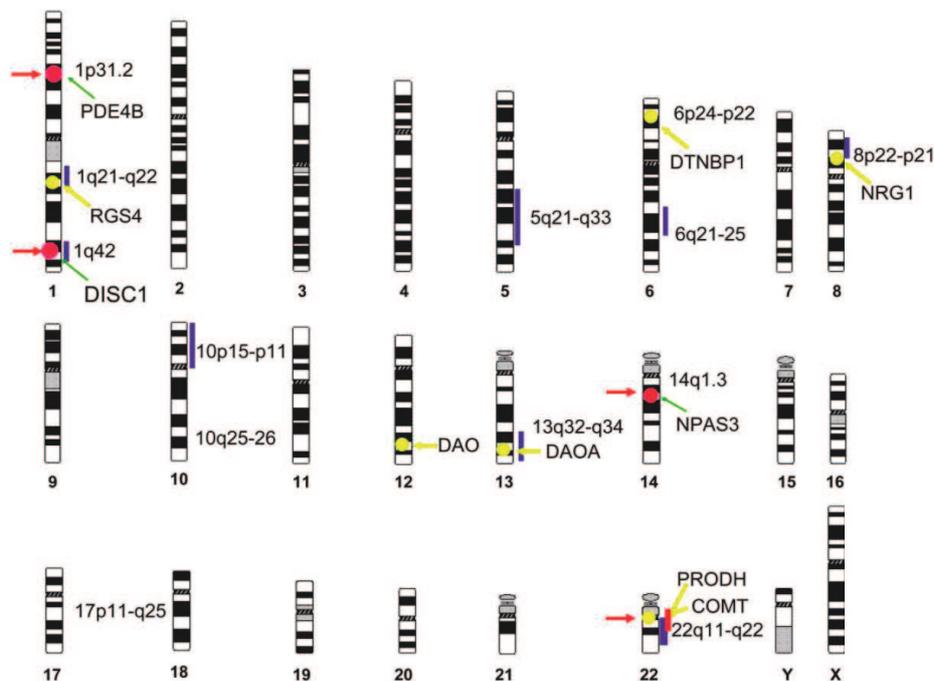


Figure 12 : Représentation schématique des principales régions chromosomiques impliquées dans les études de liens génétiques. Les traits bleus indiquent les régions des évidences de liens génétiques. Les traits rouges indiquent les régions qui présentent un fort lien génétique. Les cercles jaunes représentent les loci des gènes possiblement impliqués dans la schizophrénie (O'Donovan et al. 2003).

Des liens génétiques ont pu être également établis pour la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) qui est une enzyme dégradant spécifiquement la dopamine et ses dérivés (adrénaline, noradrénaline...). Toutefois, ces évidences de

liens génétiques présentées ici ne sont pas exhaustives (voir tableau 2). En effet, d'autres fonctions sont altérées comme par exemple, la croissance axonale. Ainsi des gènes comme DISC1, dont la protéine est impliquée dans la croissance axonale, ont été identifiés comme un facteur de risque génétique mettant ainsi en lumière l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie.

		Strength of evidence (0 to 5+)				
		Association with schizophrenia	Linkage to gene locus	Biological plausibility	Altered expression in schizophrenia	
COMT	22q11	+++	++++	++++		Yes, +
DTNBP1	6p22	+++++	++++	++		Yes, ++
NRG1	8p12-21	+++++	++++	+++		Yes, +
RGS4	1q21-22	+++	+++	+++		Yes, ++
GRM3	7q21-22	+++	+	++++		No, ++
DISC1	1q42	+++	++	++		Not known
DAOA (G72/G30)	13q32-34	+++	++	++		Not known
DAAO	12q24	++	+	++++		Not known
PPP3CC	8p21	+	++++	++++		Yes, +
CHRNA7	15q13-14	+	++	+++		Yes, +++
PRODH2	22q11	+	++++	++		No, +
AKT1	14q22-32	+	+	++		Yes, ++
GAD1	2q31.1	++		++		Yes, +++
ERBB4	2q34	++				Yes, ++
FEZ1	11q24.2	++		+++		Yes, ++
MUTED	6p24.3	++++	++++	+++		Yes
MRDS1 (OFCC1)	6p24.3	++	++++	+		Not known

Tableau 2 : Gènes de susceptibilités impliqués dans la schizophrénie, classés sous quatre catégories avec leurs niveaux de probabilité (Straub and Weinberger 2006).

On constate ainsi que les liens génétiques qui ont pu être identifiés à ce jour, concernent principalement deux grandes classes de neurotransmetteurs que sont le glutamate, par l'intermédiaire notamment du récepteur NMDA et la dopamine. Dès lors, comment est-il possible de réconcilier ces données pour une théorie unifiée de la schizophrénie et en particulier, des altérations moléculaires et neurochimiques au niveau du cortex préfrontal ?

En fait, il est possible de faire converger les hypothèses : dopaminergique glutamatergique et GABAergique, de la physiopathologie de la schizophrénie dans un même modèle à l'échelle moléculaire (Figure 13). Selon ce modèle, il y a des événements en amont, incluant des facteurs de risque génétique comme NRG1, qui entraînent une diminution de l'activité des récepteurs NMDA. Cette réduction de la transmission excitatrice glutamatergique induit d'une part, une diminution de l'activité des neurones dopaminergiques se projetant sur le cortex préfrontal et d'autre part, cette hypofonctionnalité des récepteurs NMDA a pour conséquence une diminution de l'activité gabaergique, notamment des neurones à chandelier et pyramidaux.

L'ensemble de ces altérations moléculaires conduit à une diminution des oscillations gamma et une diminution de la fréquence de décharge des neurones.

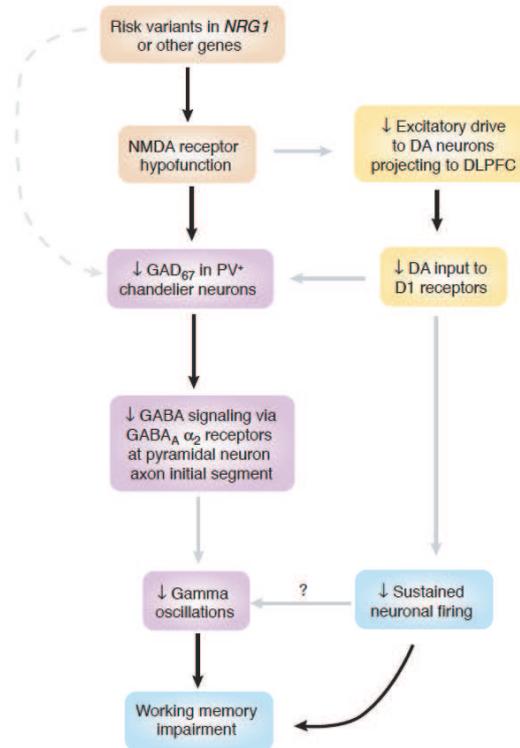


Figure 13 : modèle illustrant les altérations au niveau moléculaire dans le PFC. Ces altérations incluent, les liens génétiques entre schizophrénie et notamment NRG1, le système dopaminergique, glutamatergique et GABAergique. Le récepteur NMDA occupe une place centrale dans cette cascade moléculaire. L'ensemble de ces altérations entraîne un déficit de la mémoire de travail (Lewis and Gonzalez-Burgos 2006).

• Comme nous venons de le mentionner, le cortex préfrontal est le siège d'importantes modifications et donc une cible de choix pour répondre à cette question et ceci à plusieurs titres :

- Tout d'abord, le cortex préfrontal est une structure majeure impliquée dans la schizophrénie, notamment au niveau des troubles négatifs et cognitifs.
- Deuxièmement, le cortex préfrontal présente des afférences dopaminergiques provenant entre autres, de l'aire tegmentale ventrale.
- Troisièmement, le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le cortex préfrontal dans lequel se trouve un grand nombre de cellules pyramidales glutamatergiques.

•Finalement, il existe une forte interaction entre le système dopaminergique et le système glutamatergique, aussi bien au niveau synaptique qu'à celui des récepteurs.

Partie 2 Cortex préfrontal et interactions entre dopamine et glutamate.

2.1 Anatomie et connectivité

Le cortex préfrontal chez le primate est localisé en position médiane, latérale et orbitale de la partie la plus antérieure du lobe frontal ; en partie postérieure, on trouve les aires motrices et prémotrices (Figure 14). Il est directement impliqué dans les processus cognitifs de haut niveau comme l'attention, la prise de décision, les émotions et la personnalité. Au niveau phylogénétique, il trouve son apogée chez l'humain. En effet, la taille relative du cortex préfrontal n'a cessé d'augmenter au cours du développement phylogénique, passant de 3,5 % chez le chat à 11,5 % chez le macaque, 17 % chez le chimpanzé et enfin 29 % du cortex chez l'humain.

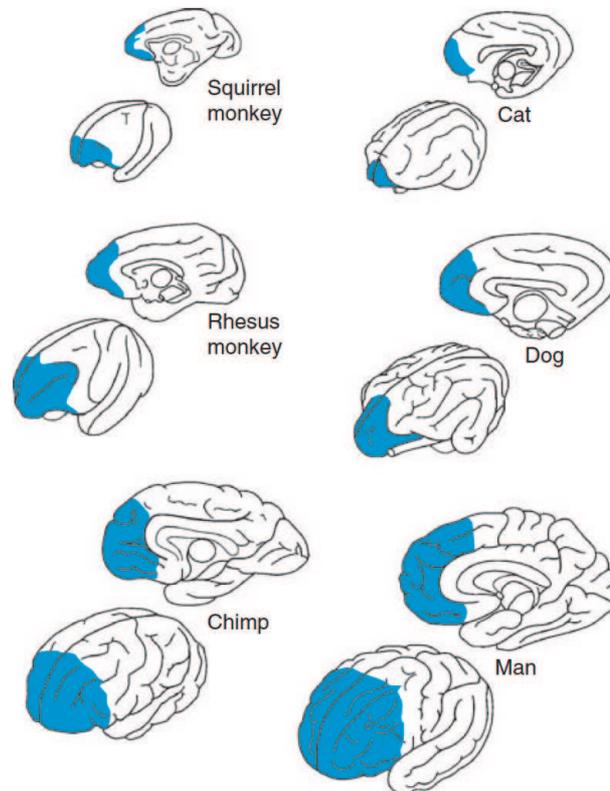


Figure 14 : Localisation du cortex préfrontal (en bleu) pour six espèces de mammifères (Fuster 2008).

Le cortex préfrontal est connecté avec de nombreuses structures sous-corticales (diencéphale, mésencéphale et système limbique) par des boucles cortico-striato-thalamo-corticales ainsi qu'avec de nombreuses aires corticales sensorielles [principalement somatiques, auditives et visuelles (Fuster 2008)]. Par ailleurs, les différentes aires du cortex préfrontal sont richement interconnectées, cette importante innervation suggère que le cortex préfrontal constitue le cortex associatif du lobe frontal (Figure 15).

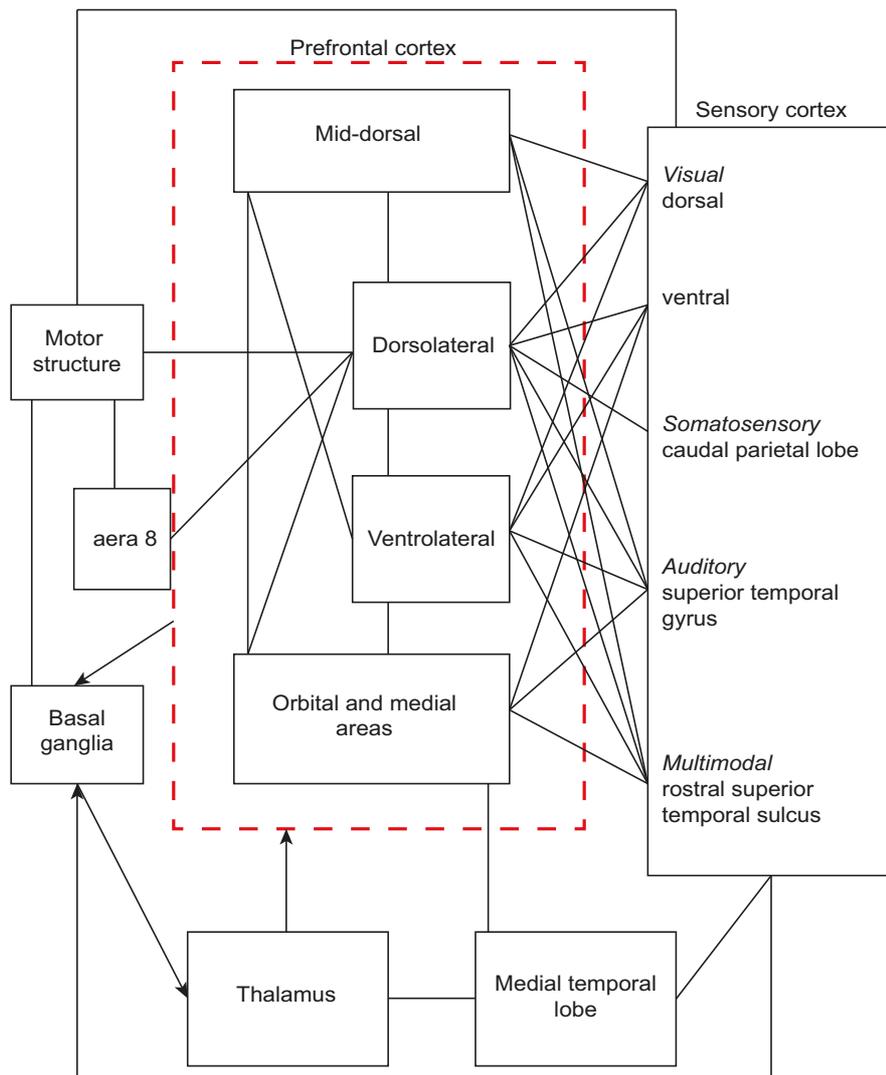


Figure 15 : Les connexions intracorticales et sous-corticales du cortex préfrontal. Diagramme schématisé des connexions extrinsèques et intrinsèques du cortex préfrontal. La plupart des connexions sont réciproques, les exceptions sont notées par les flèches (Miller and Cohen 2001).

Ces connexions ont pour résultante la mise en place de systèmes de contrôles directs et de retro-contrôles dont l'importance est capitale. En effet, ces deux systèmes de contrôles permettent de moduler la neurotransmission des neurones pyramidaux et non-pyramidaux, ainsi que leurs interactions.

Le cortex préfrontal présente une cytoarchitecture très proche des autres régions corticales. Il est organisé en six couches, la distinction entre couches successives se se faisant sur les différents types cellulaires rencontrés (figure 16).

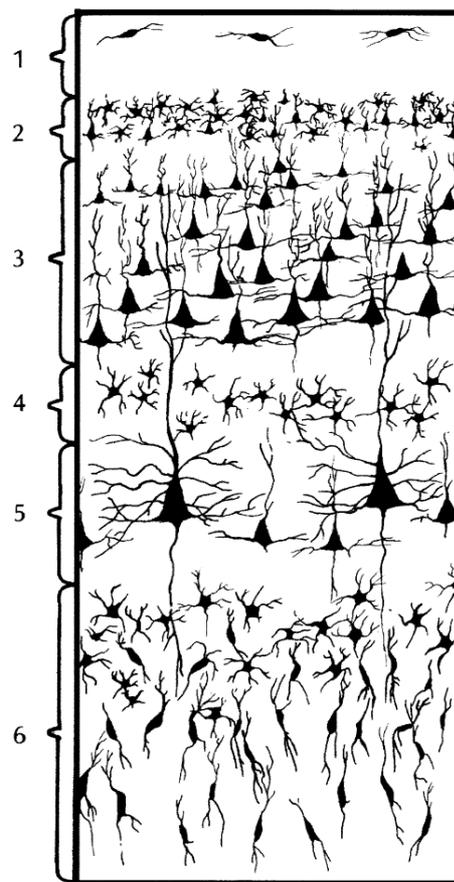


Figure 16 : Représentation schématique des six couches du cortex préfrontal, illustrant les différents types cellulaires et leurs arrangements (Ramachandran 2002).

La couche 1 connue sous le nom de couche moléculaire est riche en fibres et en synapses avec très peu de corps cellulaires. Les cellules sont de types glial ou non-pyramidal. Cette couche contient beaucoup d'axones qui sont parallèles à la surface du cortex préfrontal.

La couche 2, connue sous le nom de couche granulaire externe, contient de petits neurones pyramidaux dont les dendrites apicales sont orientées vers la surface du cortex.

La couche 3 ou couche pyramidale externe, est relativement épaisse comparée aux couches I et II. Elle contient un grand nombre de cellules pyramidales de taille moyenne. De plus, la taille de ces cellules pyramidales augmente au fur et à mesure que l'on se rapproche de la couche IV. Les dendrites apicales, comme celles de la couche II, projettent vers la surface du cortex. Les neurones pyramidaux de cette région forment des connections avec d'autres structures cérébrales, comme le cortex cérébral dont le cortex contralatéral.

La couche granulaire interne ou couche 4 contient un grand nombre de cellules de petites tailles. On trouve deux grands types de cellules : celles dont la forme est étoilée ainsi que de petits neurones pyramidaux. Cette couche est particulièrement développée au niveau du cortex préfrontal. Toutefois, lorsque l'on se rapproche des aires motrices du lobe frontal et donc de la fin du cortex préfrontal, cette couche tend à disparaître. Par ailleurs, les espèces comme le rat ne possèdent pas de couches IV au niveau du cortex préfrontal.

La couche pyramidale interne ou couche 5 contient aussi bien des neurones pyramidaux de tailles moyennes que de grandes tailles. Comme pour les autres couches, les dendrites apicales projettent au niveau des couches I en direction de la surface du cortex.

La couche la plus profonde est dite polymorphe ou couche 6 ; elle contient des neurones de plus grande taille : les neurones étoilés, pyramidaux ou fusiformes.

2.2 Interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique du SNC

Les systèmes dopaminergique et glutamatergique entretiennent des relations étroites et réciproques et ce, à différents niveaux. L'organisation morphologique particulière de leurs synapses et les interactions moléculaires de leurs récepteurs, permettent d'expliquer le couplage neurochimique et synaptique ainsi que les conséquences physiologiques qui en découlent.

2.2.1 Interactions neurochimiques et organisation morphologique

Le PFC est une structure clef pour l'étude de la modulation de la libération de dopamine dans le SNC. En effet, les neurones pyramidaux glutamatergiques du PFC et en particulier des couches V/VI, se projettent notamment sur les neurones dopaminergiques et GABAergiques du noyau accumbens (NAc) (Del Arco and Mora 2009). D'autre part, les neurones pyramidaux du PFC reçoivent des afférences dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et des afférences glutamatergiques de l'hippocampe, du thalamus et de l'amygdale notamment (Del Arco and Mora 2009). Les niveaux de dopamine détectés par microdialyse dans le NAc sont diminués, à la suite d'une injection de quinpirole dans le PFC, un agoniste des récepteurs de la dopamine de type D2. Ces observations impliquent que les neurones pyramidaux expriment des récepteurs dopaminergiques dont l'activation conduit à la diminution de l'activité des neurones pyramidaux du PFC se projetant sur les neurones dopaminergiques du NAc. Au contraire, l'injection dans le PFC du rat de 4-[(2E)-3-Phosphono-2-propenyl]-2-piperazinecarboxylic acid (CPP), un antagoniste des récepteurs NMDA, augmente les niveaux de dopamine dans le NAc (Del Arco et al. 2008). Ces résultats supportent l'idée d'une voie indirecte PFC→NAc, impliquant des neurones GABAergiques et dont l'inhibition (du fait de l'inhibition par le CPP de l'activité des neurones glutamatergiques) a pour conséquence d'augmenter l'activité des neurones dopaminergiques du NAc. ces données supportent l'hypothèse glutamatergique de la schizophrénie selon laquelle une hypofonction du récepteur NMDA dans le PFC entraînerait une hyperdopaminergie dans les régions sous corticales et en particulier, des ganglions de la base (Lewis and Gonzalez-Burgos 2006).

Toutefois, ces interactions entre systèmes dopaminergiques et glutamatergiques ne sont pas spécifiques du PFC puisqu'elles ont été mises en évidence dans d'autres structures cérébrales. En effet, dans la substance noire, la libération de glutamate est contrôlée par les fibres cholinergiques provenant du noyau sous-thalamique. L'application, *in vivo*, de carbachol, un agoniste cholinergique, augmente la libération de glutamate qui est abolie si l'on injecte dans la substance noire du

quinpirole (10 μ M), un agoniste des récepteurs D2. Par opposition, l'injection de raclopride (100 μ M), un antagoniste des récepteurs D2, augmente la libération de glutamate due à la stimulation des fibres cholinergiques par le carbachol (Hatzipetros and Yamamoto 2006). Ces travaux démontrent ainsi la modulation de la libération de glutamate par la dopamine d'une part et suggèrent d'autre part, l'existence de récepteurs dopaminergiques sur les neurones glutamatergiques. Une modulation du système glutamatergique par le système dopaminergique a été constatée aussi dans le striatum (Yamamoto and Davy 1992). Ainsi, l'injection de KCl dans le striatum augmente-t-elle la libération de glutamate. Cet effet est aboli lorsque le KCl est injecté simultanément avec le LY171355, un agoniste des récepteurs de la dopamine de type D2. Par opposition, l'injection concomitante de potassium avec le SKF38393, un agoniste des récepteurs de la dopamine de type D1, augmente la libération de glutamate.

En contre partie, le système glutamatergique peut réguler l'activité des neurones dopaminergiques. En effet, l'injection de NMDA dans le noyau sous-thalamique entraîne une augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine dans cette structure. Cette augmentation est provoquée par l'activation des récepteurs NMDA présents sur les afférences dopaminergiques nigro→sous-thalamiques (Ampe et al. 2007). Il est intéressant de noter que l'injection de NMDA dans le noyau sous-thalamique a pour autre effet d'augmenter la libération de glutamate et de GABA. L'augmentation de glutamate résulte de l'activation des récepteurs de la dopamine de type D1 et D2 localisés sur les neurones glutamatergiques provenant du cortex. L'augmentation de GABA, quant à elle, résulte de l'augmentation de l'activité des neurones glutamatergiques qui se projettent sur les neurones GABAergiques du globus pallidus dont la résultante est une élévation de la libération de GABA dans le noyau sous-thalamique (Ampe et al. 2007).

L'ensemble de ces travaux met en évidence l'importance des interactions entre glutamate et dopamine dans le SNC. Ces interactions ont pour substrat une organisation neuroanatomique des synapses, spécifique en particulier dans le cortex cérébral. En effet, dans le cortex cérébral, les études en microscopie électronique ont révélé l'existence de complexes synaptiques, également appelés triades, constitués

par une épine dendritique d'un neurone pyramidal et de deux boutons glutamatergique et dopaminergique (Cepeda and Levine 2006) (Figure 17). Cette organisation permet d'expliquer, à l'échelle cellulaire, les effets de l'activation/inactivation du système dopaminergique sur l'activité des neurones glutamatergiques et vice et versa dans le PFC.

Cette triade synaptique est la base morphologique des interactions moléculaires entre récepteurs dopaminergiques et glutamatergiques. Ces interactions sont de deux types : le premier implique des voies de signalisation intracellulaire permettant le couplage fonctionnel des récepteurs au glutamate et des récepteurs de la dopamine (Figure 17) ; le second opère par l'intermédiaire d'hétérodimérisation entre ces récepteurs.

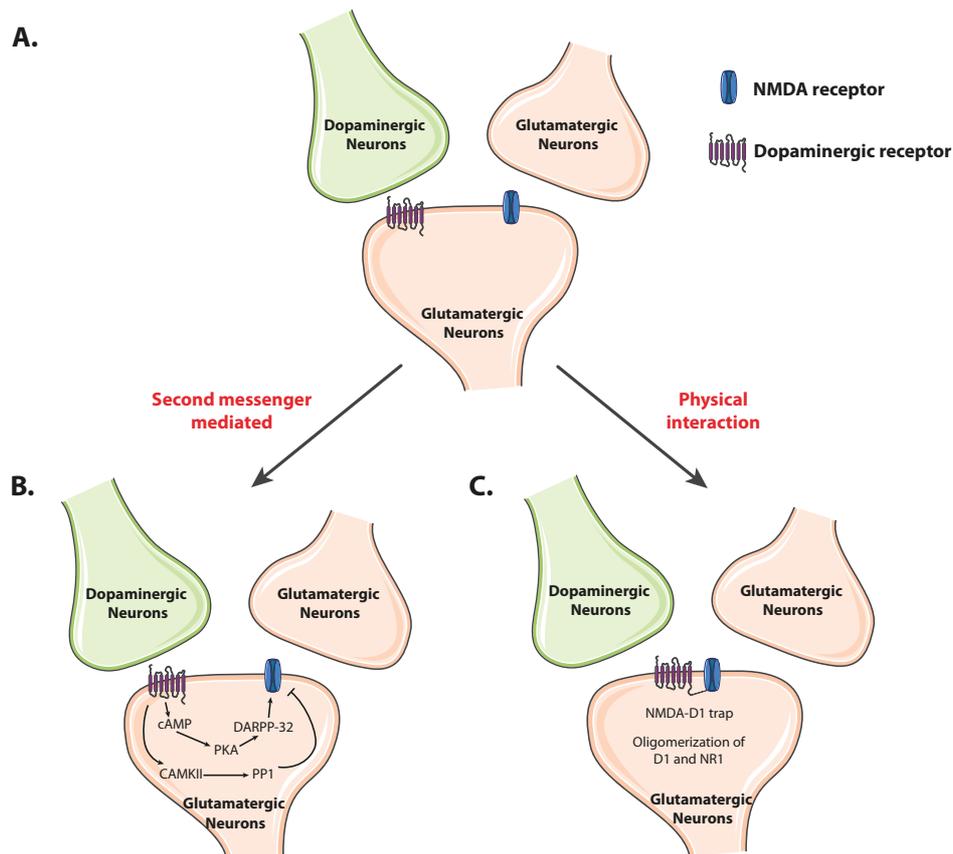


Figure 17 : Représentation de la triade ou complexe synaptique. A. Le bouton glutamatergique postsynaptique est en contact avec un bouton dopaminergique et un bouton glutamatergique. B. Les interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique s'effectuent par des seconds messagers intracellulaires, impliquant notamment la PKA ou la phosphatase PP1. C. Des liens physiques entre récepteurs de la dopamine et au glutamate ont été mis en évidence au niveau postsynaptique.

2.2.2 Interactions Glu-DOPA à l'échelle de la synapse

Les interactions neurochimiques entre Glu et DOPA peuvent être transposées à l'échelle des neurones et des synapses. En effet, les approches électrophysiologiques de l'activité synaptique ont permis de mettre en évidence que l'application de dopamine sur des tranches aiguës de PFC exerce des effets biphasiques sur l'activité des neurones glutamatergiques pyramidaux. Chez le rat, l'application de dopamine à 10 μM augmente l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs NMDA (EPSCs-NMDA) (Figure 18, (Zheng et al. 1999; Seamans et al. 2001; Chen et al. 2004)). Ces effets de la dopamine sont reproduits par l'application d'un agoniste des récepteurs D1 comme le SKF38393. Par ailleurs, cette modulation positive dépend en partie du calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). En effet, l'application du SKF38393 en présence de BAPTA, un chélateur de calcium, ou d'un inhibiteur de PKA (H-89), introduit dans le neurone postsynaptique glutamatergique par la pipette de patch, réduit l'effet potentialisateur de l'agoniste D1. Ces résultats indiquent que les effets de la dopamine à faible concentration impliquent les récepteurs de la dopamine de type D1 dont l'activation entraîne celle de la voie AC-PKA et, in fine, à une élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responsable de l'augmentation de l'activité des neurones glutamatergiques. A forte concentration (100 μM), la dopamine a, au contraire, un effet inhibiteur sur l'amplitude des EPSCs-NMDA (Zheng et al. 1999; Seamans et al. 2001; Chen et al. 2004). Ces effets dopaminergiques inhibiteurs sont mimés par le quinpirole, un agoniste des récepteurs de la dopamine de type D2. On a donc un effet biphasique de la dopamine sur l'amplitude des courants NMDA synaptiques, positive à faible concentration et négative à forte concentration.

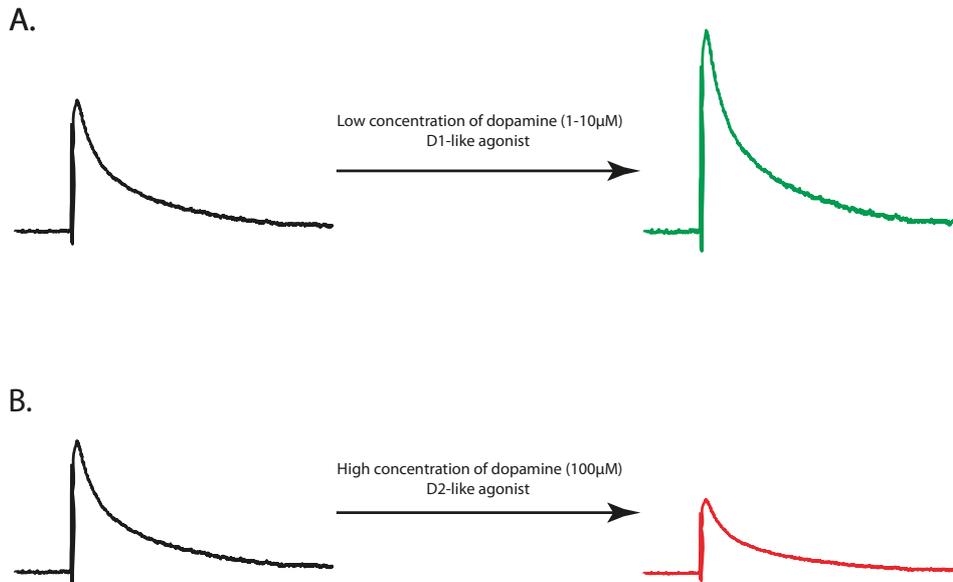


Figure 18: Effet de la dopamine sur les courants NMDA synaptiques. Représentation schématique de courants NMDA des neurones pyramidaux enregistrés à +40mV en mode voltage imposé par la technique de patch-clamp dans le cortex préfrontal. A : effet d'une faible concentration de dopamine ou d'agonistes des récepteurs D1-like sur la modulation de l'amplitude des courants NMDA. B. Effet d'une forte concentration de dopamine ou d'agonistes des récepteurs D2-like sur la modulation de l'amplitude des courants NMDA.

Toutefois, cette modulation de la transmission glutamatergique par la dopamine est limitée aux seuls récepteurs NMDA. En effet, aucune modification de l'amplitude EPSCs-AMPA n'a été mesurée lors de l'application de dopamine et ce quelle que soit la concentration utilisée (Zheng et al. 1999; Seamans et al. 2001). Cette absence d'effet de la dopamine sur l'activité des récepteurs AMPA synaptiques peut s'expliquer par le fait que l'activation des récepteurs de la dopamine de type D1 augmente principalement l'insertion des récepteurs AMPA extra-synaptiques (Sun et al. 2005). De plus, l'activation des récepteurs D2-like bloque l'augmentation de l'insertion des récepteurs AMPA par les récepteurs D1-like.

Nous venons de voir que la dopamine affecte la transmission synaptique glutamatergique par le biais d'une modulation spécifique des courants NMDA. Or, le récepteur NMDA est impliqué dans différentes formes de plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme et la dépression à long terme (Mlenka et Bear, Cell; Collogingridge et al. Nat Rev Neurosc, 2010). Il est donc légitime d'envisager que la dopamine puisse moduler la plasticité synaptique à long terme.

Une des premières démonstrations de l'implication de la dopamine dans la plasticité des synapses glutamatergiques du PFC a été conduite par Otani et ses collègues (Otani et al. 1998). Dans cette étude, ces auteurs ont montré que l'application d'un protocole de stimulation tétanique (100 pulses à 50 Hz, répétés 4 fois à une fréquence de 0,1Hz) des couches I-II en présence de dopamine (100 μ M) induit une LTD NMDA indépendante des neurones des couches V. Selon ces auteurs, la dopamine aurait un rôle facilitateur sur la LTD en activant des récepteurs D1 et D2 ce qui induirait une dépolarisation postsynaptique et donc l'entrée de calcium (Otani et al. 1998). Dans une étude plus récente, ces mêmes auteurs ont montré que dans le PFC, la pré-stimulation des récepteurs D1 et D2 avant le protocole de LTD ou la perfusion de faibles concentrations de dopamine (3 μ M) permet de transformer une LTD NMDA indépendante en une LTP NMDA dépendante puisque bloquée par l'AP5, un antagoniste des récepteurs NMDA (Matsuda et al. 2006). D'autre part, Xu et ses collègues ont montré qu'une hyperdopaminergie provoquée par l'inactivation du transporteur DAT bloque l'induction de la LTP dans le PFC chez la souris et ce, du fait de l'activation des récepteurs D2 (Xu et al. 2009). Dans une autre structure cérébrale, l'hippocampe, la dopamine affecte également la plasticité à long terme des synapses glutamatergiques. Au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, l'application du SKF38393, un agoniste des récepteurs de la dopamine D1/D5, après un protocole de stimulation à basse fréquence des collatérales de Schaffer, abolit la LTD résultante de ce type de protocole (Mockett et al. 2007). Dans le subiculum, l'activation des récepteurs de type D1/D5 facilite l'induction de la LTP après un protocole de stimulation à haute fréquence (HFS) dans l'hippocampe (Roggenhofer et al. 2010). La dopamine joue donc un rôle majeur dans la plasticité des synapses glutamatergiques en facilitant l'induction de la LTP et l'abolition de la LTD via les récepteurs D1/D5. Par opposition, l'activation les récepteurs de type D2 engendre une LTD.

Nous venons de voir que la dopamine est directement impliquée dans la modulation de la transmission glutamatergique et de la plasticité synaptique à long terme, en modulant l'activité du récepteur NMDA. Les récepteurs au glutamate, comme les récepteurs NMDA et AMPA, contrôlent l'excitabilité neuronale, puisque

l'application de leur agoniste, le NMDA ou l'AMPA, a pour effet d'augmenter la fréquence de décharge des neurones pyramidaux du PFC (Tseng and O'Donnell 2004). Par ailleurs, comme pour la transmission synaptique impliquant les récepteurs NMDA, l'activation des récepteurs de la dopamine de type D1 ou D2 aura des conséquences différentes sur l'excitabilité neuronale (Figure 19). En effet, l'application de SKF38393, un agoniste D1/D5, augmente la fréquence de décharge des neurones pyramidaux (Wang and O'Donnell 2001) du PFC, alors que l'application de quinpirole la diminue (Tseng and O'Donnell 2004). Ces résultats sont reproduits lors de l'application concomitante de NMDA et d'un agoniste des récepteurs de type D1/D5 ou d'un agoniste des récepteurs de type D2 (Tseng and O'Donnell 2004). Finalement, en comparaison de l'effet de l'AMPA seul, l'application d'AMPA et de quinpirole diminue la fréquence de décharge des neurones pyramidaux. L'application d'AMPA seul ou d'AMPA et de SKF38393 augmente la fréquence de décharge de manière identique (Tseng and O'Donnell 2004). En conclusion, les récepteurs D1/D5 et de type D2 sont impliqués dans la modulation de la fréquence de décharge des neurones pyramidaux du PFC induite par les récepteurs NMDA. Alors que seuls les récepteurs D2 sont impliqués dans la modulation de la fréquence de décharge induite par les récepteurs AMPA. Ces effets inhibiteurs D2R/AMPA sur l'excitabilité neuronale sont attribués à l'activation d'une voie intracellulaire impliquant la PLC, l'IP3 et donc une élévation de $[CA^{2+}]_i$ ainsi qu'une inhibition de la PKA (Tseng and O'Donnell 2004).

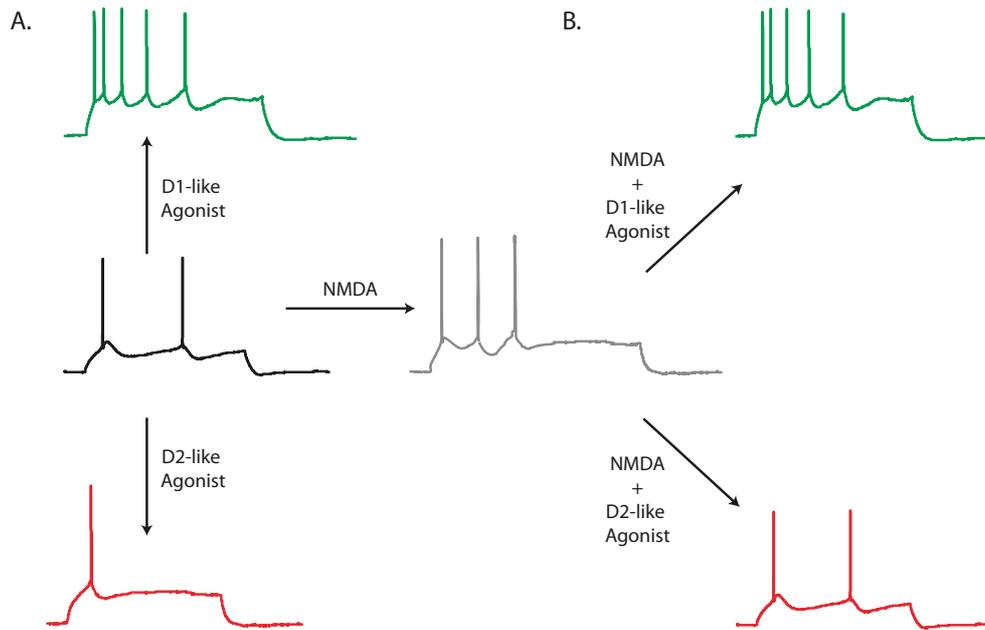


Figure 19 : Représentation schématique de l'effet modulateur des récepteurs de la dopamine de D1/D5 et type D2 sur l'excitabilité des neurones pyramidaux dans le cortex préfrontal. A. Les agonistes D1/D5 augmentent la fréquence de décharge des neurones pyramidaux (vert) par opposition, les agonistes D2 diminuent la fréquence de décharge (rouge). B. L'application de NMDA et d'agonistes des récepteurs de la dopamine D1/D5 et de type D2, respectivement augmentent et diminuent la fréquence de décharge des neurones pyramidaux (Wang and O'Donnell 2001; Tseng and O'Donnell 2004).

2.2.3 Interactions entre récepteurs glutamatergiques et dopaminergiques.

Les systèmes glutamatergiques et dopaminergiques sont intimement liés. Au niveau cellulaire, il existe deux niveaux d'interactions : le premier implique des interactions indirectes par les voies de signalisation intracellulaire et le second des couplages physiques entre récepteurs de la dopamine et au glutamate.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la triade synaptique est la base morphologique des interactions moléculaires entre récepteurs dopaminergiques et glutamatergiques. Elle permet d'expliquer les modulations des EPSCs-NMDA ainsi que les phénomènes de plasticité à long terme NMDA dépendante. Tout d'abord, il est clairement établi que les récepteurs de la dopamine de type D1 activent la cascade intracellulaire cAMP-PKA-DARPP-32. Cette voie de signalisation intracellulaire induit une augmentation de la phosphorylation de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA et donc une augmentation de l'amplitude des EPSCs NMDA. Par ailleurs, l'activation des récepteurs D1 augmente l'insertion des récepteurs

NMDA à la membrane par l'intermédiaire de la protéine tyrosine kinase FYN (Dunah and Standaert 2001; Dunah et al. 2004). Par opposition, l'activation des récepteurs D2 diminue l'activité du récepteur NMDA en déphosphorylant la sous-unité NR1 par l'intermédiaire de la CaMKII et de la PP1. D'autre part, l'activation des récepteurs D2 entraîne une internalisation des récepteurs NMDA (Wang et al. 2003). Wang et ses collaborateurs ont montré sur des neurones en culture et par des mesures de l'expression surfacique de NR1, que l'application d'un agoniste D4, le PD168077 (40 μ M) entraîne une internalisation des récepteurs NMDA par l'activation de CaMKII (Wang et al. 2003).

Les voies intracellulaires ne sont pas les seuls mécanismes d'interactions entre récepteurs dopaminergiques et récepteurs NMDA. En effet, comme nous allons le voir, les récepteurs de la dopamine ont la propriété de former des hétérodimères avec d'autres récepteurs, en particulier les récepteurs au glutamate. En 2002, Lee et ses collaborateurs ont démontré que les récepteurs D1, par l'intermédiaire des domaines T2 et T3 sur leurs extrémités C-terminale cytosoliques, sont couplés physiquement avec les récepteurs NMDA (Lee et al. 2002). Des expériences de co-immunoprécipitation à partir d'hippocampe de rat ont mis en évidence que la sous-unité NR1 est liée avec le domaine T2 alors que la sous-unité NR2A est liée avec le domaine T3. Ce lien physique entre les deux récepteurs a deux conséquences. Tout d'abord, l'enregistrement des EPSCs-NMDA sur des neurones dissociés d'hippocampe montre une diminution de ces EPSCs-NMDA à la suite de l'activation du récepteur D1. Ces auteurs montrent que cette inhibition est indépendante de la voie PKA/PKC et que l'injection d'un peptide interférant avec le domaine T3 bloque l'effet inhibiteur de l'agoniste D1 alors qu'un peptide bloquant l'intégration NR1 avec T2 n'a pas d'effet. Cette diminution est due à l'interaction physique entre le récepteur D1 et la sous-unité NR2A du récepteur NMDA qui entraîne une internalisation des récepteurs NMDA (Lee and Liu 2004; Cepeda and Levine 2006). L'activation des récepteurs D5 induit aussi une diminution des EPSCs-NMDA mais l'injection du peptide T3 n'a pas d'effet. Le récepteur D1 peut aussi se lier physiquement avec la sous-unité NR1 du récepteur NMDA. L'activation du récepteur de la dopamine D1 déclenche un découplage de NR1 et de D1 permettant le recrutement par la sous-

unité NR1 de la CAM et de la PI3Kinase et s'avère neuroprotecteur (Lee et al. 2002; Lee and Liu 2004). Finalement, ce découplage D1-NR1 est indispensable à l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Nai et al. 2009).

Par ailleurs, les récepteurs D1 et les récepteurs D3 peuvent former des hétérodimères, mis en évidence par les techniques de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) et de co-immunoprécipitation (Fiorentini et al. 2008). Ces hétérodimères stimulent l'AC plus fortement que le récepteur D1 seul. De plus, ces interactions physiques entre D1 et D3 entraînent une plus forte sensibilité de D1 pour ses agonistes (Fiorentini et al. 2008) et pourraient de ce fait, trouver des applications thérapeutiques notamment dans le traitement de la maladie de Parkinson.

En 2004, Lee et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence l'existence d'hétérodimères formés par les récepteurs D1 et D2 (Lee et al. 2004). Seule l'activation de ces hétérodimères D1/D2 stimule une voie métabolique impliquant la PLC qui provoque une augmentation de $[CA^{2+}]_i$. L'activation concomitante des récepteurs D1 et D2 non hétérodimériques est sans effet (Lee et al. 2004). Par ailleurs, les récepteurs D2 forment aussi des hétérodimères avec les récepteurs D3. Ce complexe de récepteurs diminue la sensibilité des récepteurs D2 à certains agonistes tels le quinpirole ou l'aripripazole (Scarselli et al. 2001).

Finalement, d'autres formes d'hétérodimères, notamment entre les récepteurs adénosine A1 et les récepteurs D1, adénosine A2 et les récepteurs D2 ou D3, somatostatine SST5 et les récepteurs D2 ainsi que des supers complexes « adénosine A2, récepteurs D2 et récepteurs mGluR5 » ont été mis en évidence et dont les fonctions restent à définir mais qui pourraient avoir des applications thérapeutiques (Maggio et al. 2009).

Toutefois, ces études restent incomplètes dans la mesure où elles restent uniquement centrées sur les interactions neuronales. Or, il est maintenant clairement démontré que les neurones ne sont pas les seuls acteurs de la transmission synaptique. En effet, comme nous allons le développer, d'autres cellules, les astrocytes, participent activement à la modulation de la transmission synaptique, aussi bien au niveau de la recapture des neurotransmetteurs qu'au niveau la libération de gliotransmetteur.

Partie 3: La synapse tripartite.

Longtemps, la synapse a donc été considérée comme bipartite, cependant les neurones ne constituent pas le seul type cellulaire du parenchyme nerveux. En effet, les cellules gliales représentent jusqu'à 50 % de la masse du cerveau (Laming et al. 2000).

3.1 Les cellules gliales d'un point de vue historique.

Parallèlement à la découverte des neurones, un deuxième type cellulaire fut identifié : la cellule gliale. En effet, en 1846, Rudolf Vichow découvrit une substance interstitielle, non nerveuse, qu'il nomma la névroglie, pour faire référence à une substance de "connection" qu'il définit comme une sorte de ciment du système nerveux central. Bien que la première image d'une cellule gliale fut réalisée en 1851 par Heinrich Müller, c'est Otto Deiters qui fut considéré comme la première personne à illustrer un type cellulaire qui ressemblait à ce que Michael von Lenhossek nomma en 1893 : astrocyte.

Récemment encore, on pensait que la glie avait un rôle passif, et servait d'apport énergétique : Camillo Golgi avait pertinemment noté que les vaisseaux sanguins étaient en contact avec des processus appartenant à la névroglie. Sur de fines tranches de cortex, il révéla la présence de cellules rondes, ovales ou étoilées à partir desquelles de nombreux, longs et fins prolongements émergeaient. En 1909, Cajal admit qu'il existait deux éléments distincts : le neurone et la cellule gliale. Les fonctions des cellules gliales et plus particulièrement celles des astrocytes, ont été établies à partir de données histologiques. Ces cellules, selon Golgi, du fait des contacts qu'elles établissent avec les capillaires, joueraient un rôle dans l'apport des nutriments essentiels à l'activité des neurones : c'est la théorie alimentaire. Selon la théorie de Weigert, la glie aurait un rôle passif, en remplissant les espaces non occupés par les neurones. Enfin, Ramon y Cajal proposa que ces cellules pourraient jouer le rôle d'isolant physique lors de la conduction de l'influx nerveux.

3.2 Les différents types de cellules gliales du système nerveux.

Les cellules gliales représentent deux grandes familles de cellules : la macroglie et la microglie. Dans le système nerveux central, les cellules macrogliales sont représentées par les oligodendrocytes, responsables de la myélinisation des axones, et les astrocytes. Les astrocytes sont les plus nombreux, ils constituent un tiers des cellules du parenchyme nerveux (Simard and Nedergaard 2004). Dans le système nerveux périphérique, les cellules de Schwann jouent le rôle des oligodendrocytes. Enfin, les cellules microgliales sont principalement considérées comme les cellules immunitaires du cerveau (Farber and Kettenmann 2005).

3.3 La synapse tripartite : le troisième élément.

Dans le système nerveux central, les astrocytes entretiennent avec les neurones des relations anatomiques étroites, au niveau de la plupart des synapses (Ventura and Harris 1999). Le recouvrement des éléments synaptiques neuronaux par les processus astrocytaires peut être total (Ventura and Harris 1999). Par conséquent, les astrocytes sont idéalement positionnés pour interagir avec les neurones au cours de la transmission synaptique (Figure 20). Cependant, les approches électrophysiologiques ont révélé que les cellules gliales, malgré l'existence de conductances dépendantes du potentiel de membrane (Barres 1991; Sontheimer 1994), n'étaient pas capables de générer des potentiels d'action : les astrocytes sont électriquement silencieux. Toutefois, le développement de l'imagerie par sondes calciques a permis d'identifier la carte d'identité de l'excitabilité gliale : le langage des astrocytes est basé sur des variations de la concentration de calcium intracellulaire. C'est grâce à cette avancée technologique que les interactions neurones-glies ont émergé avec le concept de synapse tripartite, dans lequel la synapse est formée des éléments neuronaux pré- et post-synaptiques et du fin processus astrocytaire.

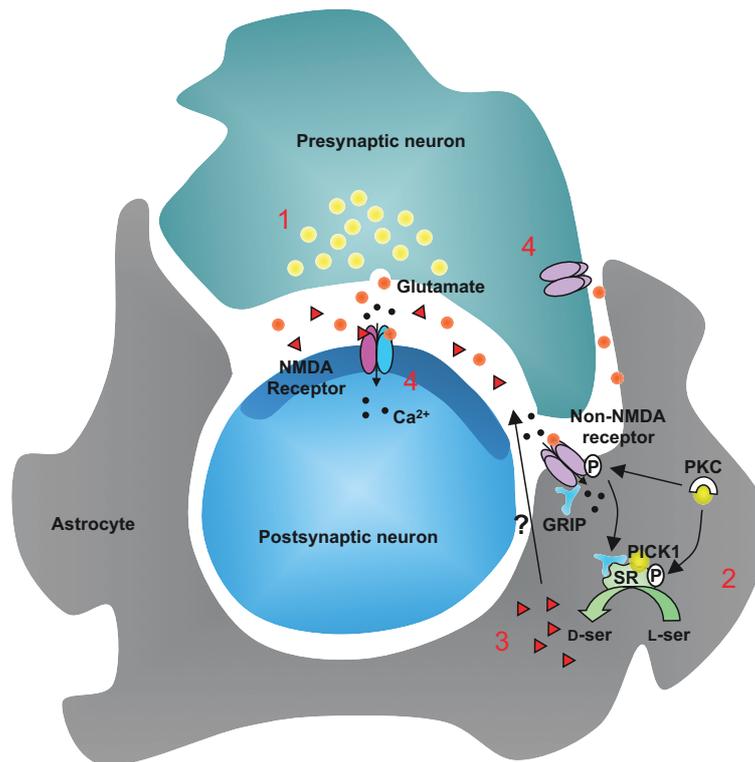


Figure 20 : Synapse tripartite et transmission synaptique. Une fois libéré dans la fente synaptique (1), le neurotransmetteur active des récepteurs présents sur le neurone post-synaptique mais aussi sur les processus astrocytaires (2). Leur activation conduit à la libération de gliotransmetteurs (3). Ces gliotransmetteurs modulent la transmission synaptique en activant les récepteurs neuronaux pré-, post- ou extra-synaptique.

La participation astrocytaire dans la transmission de l'information peut se décliner en trois étapes :

- la détection du signal synaptique ;
- l'intégration du signal synaptique ;
- et la libération de substances informatives appelées gliotransmetteurs.

3.4 Détection astrocytaire du signal synaptique.

La transmission synaptique repose sur la libération présynaptique du neurotransmetteur, sa liaison avec le récepteur postsynaptique et son élimination de la fente synaptique soit par diffusion, recapture ou dégradation dans l'espace extracellulaire (exemple de l'acétylcholine). Les astrocytes détectent l'activité synaptique du fait de la présence de systèmes de recaptures et de récepteurs pour différents neurotransmetteurs, exprimés à la surface de leur membrane plasmique.

Le rôle des astrocytes dans la transmission synaptique a tout d'abord été démontré par la mise en évidence que ces cellules participaient activement à la recapture des neurotransmetteurs, un processus de vidange de l'espace synaptique en neurotransmetteurs et ce grâce à une pléthore de transporteurs présents à leur membrane plasmique. Ainsi, les astrocytes contrôlent le profil spatiotemporel de la concentration du neurotransmetteur dans la fente synaptique (Bergles et al. 1999; Schousboe 2003). En effet, en capturant les neurotransmetteurs tels le glutamate, les transporteurs influencent l'efficacité de la transmission synaptique (Tong and Jahr 1994; Oliet et al. 2001) ainsi que l'action du glutamate à distance de son site de libération, comme par exemple aux synapses voisines (Mitchell and Silver 2000; Piet et al. 2004).

Par ailleurs, les astrocytes sondent les variations locales de leur environnement synaptique/extrasynaptique grâce à de très nombreux récepteurs. La liste des récepteurs présents à la membrane des astrocytes est exhaustive et pour exemple, il a été mis en évidence des récepteurs ionotropiques et métabotropiques au glutamate, des récepteurs adrénérgiques, GABAérgiques, cholinérgiques, histaminérgiques, purinérgiques, sérotoninérgiques mais également des récepteurs à différents neuropeptides comme l'ocytocine et la vasopressine (Murphy and Pearce 1987; Verkhratsky et al. 1998).

3.5 Intégration astrocytaire du signal synaptique.

En 1990, Cornell-Bell et collaborateurs ont découvert la carte d'excitabilité des astrocytes et ont apporté la preuve que les astrocytes ont la capacité d'être activés par des neurotransmetteurs. En effet, les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique, non seulement activent des récepteurs présents sur le neurone postsynaptique, mais également ceux présents sur la membrane astrocytaire. Ainsi, dans l'hippocampe, il a été rapporté que l'application de bradykinine sur des cultures (Parpura et al. 1994) ainsi que la stimulation des collatérales de Schaffer dans la région CA1 de l'hippocampe induisaient la libération de glutamate dans la fente

synaptique qui via l'activation de récepteurs glutamatergiques métabotropiques (Porter and McCarthy 1996) ou ionotropiques de type non-NMDA (Zhang et al. 2003), présents sur la membrane des astrocytes, augmentait la concentration du calcium astrocytaire (Porter and McCarthy 1996). Celle-ci, peut être localisée ou alors s'étendre aux astrocytes voisins sous la forme de vagues calciques (Cornell-Bell et al. 1990; Haydon 2001; Perea and Araque 2005). De plus, le glutamate n'est pas le seul neurotransmetteur à activer les astrocytes : en effet, dans le stratum radiatum de la région CA1, le GABA, libéré par les interneurones, active des récepteurs GABAB présents sur la membrane des astrocytes (Kang et al. 1998; Serrano et al. 2006). Non seulement les astrocytes détectent le signal synaptique, mais ils ont la subtile capacité de détecter différents niveaux d'activité synaptique. En effet, la stimulation des collatérales de Schaffer déclenche des oscillations calciques astrocytaires dont la fréquence d'apparition est sous le contrôle dynamique de l'activité des afférences neuronales (Pasti et al. 1997). Enfin, en exprimant de nombreux types de récepteurs (Volterra and Meldolesi 2005) et en envoyant de nombreux processus, les astrocytes, sont capables de discriminer différentes entrées synaptiques. Perea et ses collaborateurs ont en effet montré que sur des tranches aiguës d'hippocampe, la stimulation des afférences glutamatergiques, provenant des collatérales de Schaffer, induisait une augmentation de la concentration calcique, sélectivement médiée par les récepteurs glutamatergiques (Perea and Araque 2005). A l'inverse, la stimulation de l'alveus, constitué d'axones glutamatergiques et cholinergiques, augmentait le calcium astrocytaire différemment car uniquement liée à l'activation de récepteurs cholinergiques.

3.6 La gliotransmission.

Après la détection et l'intégration de l'information afférente, les astrocytes influencent en retour l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique en libérant des molécules informatives appelées gliotransmetteurs par analogie aux neurotransmetteurs. Les principaux gliotransmetteurs identifiés à ce jour sont le glutamate, l'ATP, la taurine, la D-sérine et le GABA.

3.6.1 Le glutamate.

En 1994, deux études ont révélé pour la première fois, que les astrocytes, en libérant du glutamate, étaient capables d'influencer l'activité neuronale. L'augmentation intracellulaire du Ca^{2+} glial, induite expérimentalement, activait des récepteurs NMDA sur les neurones adjacents (Nedergaard 1994; Parpura et al. 1994). Ces résultats ont été ultérieurement confirmés dans d'autres structures et sur des tranches de cerveau. Au cours de ces études (Araque et al. 1998; Parri et al. 2001; Angulo et al. 2004; Fellin et al. 2004), des stimuli entraînant des augmentations de Ca^{2+} intracellulaire dans les astrocytes induisaient l'apparition de courants entrants de cinétique lente, sous-tendus par l'activation de récepteurs NMDA comme le démontrait leur sensibilité à l'AP-5. Ces récepteurs sembleraient être localisés à l'extérieur des synapses. En effet, l'analyse de la cinétique de ces courants a montré qu'ils étaient nettement plus lents que les courants synaptiques NMDA. De plus, il a été démontré, dans l'hippocampe de rat adulte, que, contrairement aux récepteurs synaptiques, les récepteurs NMDA extrasynaptiques contenaient la sous-unité NR2B. En accord avec une localisation extrasynaptique, les courants induits par le glutamate glial étaient inhibés par l'ifenprodil un antagoniste spécifique des récepteurs contenant la sous-unité NR2B (Fellin et al. 2004).

Le glutamate libéré par un astrocyte pourrait agir simultanément sur plusieurs neurones adjacents et ainsi synchroniser leur activité électrique. Ceci a été confirmé par des enregistrements de paires de neurones dans la région CA1 de l'hippocampe (Angulo et al. 2004; Fellin et al. 2004). Toutefois, afin que cette synchronisation ait lieu, les neurones ne doivent pas être éloignés l'un de l'autre de plus de 100 μm . La libération de glutamate astrocytaire et l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques pourraient avoir d'autres conséquences fonctionnelles compte tenu du rôle joué par ces récepteurs dans le contexte de l'induction de la LTD (Liu et al. 2004), l'inhibition de CREB (Hardingham et al. 2002), et de l'activation de la voie de signalisation ERK (Krapivinsky et al. 2003).

Le glutamate d'origine astrocytaire peut également moduler la transmission synaptique en activant des récepteurs présynaptiques. Ainsi, dans une co-culture glie-neurone, il a été montré que l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules gliales augmentait la fréquence d'apparition des courants synaptiques excitateurs et inhibiteurs (Araque et al. 1998). Cet effet impliquerait des récepteurs NMDA puisque cette modulation d'origine astrocytaire est inhibée par l'AP5. Un effet similaire a été observé sur des tranches de cerveau où l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} glial par le GABA conduit à une facilitation de la libération de GABA dépendante des récepteurs NMDA et non-NMDA (Kang et al. 1998). D'autres formes de modulation synaptique sous-tendues par le glutamate libéré par les cellules gliales ont par la suite été décrites et mettraient en jeu des récepteurs présynaptiques de type mGluR (Fiacco and McCarthy 2004) et kainate (Liu et al. 2004).

Ces études démontrent que les cellules gliales, et plus particulièrement les astrocytes, pourraient intégrer l'information synaptique et en réponse, exercer un puissant rétrocontrôle sur l'excitabilité neuronale et sur la transmission synaptique.

3.6.2 L'ATP.

En 2003, Eric Newman fut le premier à démontrer que l'ATP d'origine astrocytaire influençait l'activité des neurones adjacents. Ses travaux sur la rétine ont révélé dans un premier temps, que l'ATP pouvait être libéré à partir des cellules de Müller lors d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Il a ensuite démontré que cet ATP était hydrolysé en adénosine par des ectonucléotidases présentes dans le milieu extracellulaire et que cette adénosine induisait une hyperpolarisation membranaire, entraînant donc une diminution de l'excitabilité des neurones ganglionnaires avoisinants, en activant des récepteurs A1 (Newman 2003).

À l'instar du glutamate, l'adénosine est un puissant modulateur de la transmission synaptique dans le système nerveux central. L'activation de récepteurs A1 situés sur les afférences excitatrices et inhibitrices conduit généralement à une forte inhibition de la neurotransmission (Brundage and Dunwiddie 1997). Il est donc tentant de spéculer sur le rôle des astrocytes qui, en libérant de l'ATP métabolisé en

adénosine, pourraient participer au contrôle de la transmission synaptique. Des travaux récents semblent confirmer cette hypothèse, en particulier dans le cadre de la communication intersynaptique. On sait depuis plusieurs années que la stimulation à haute fréquence de certaines voies synaptiques dans l'hippocampe entraîne une inhibition plus ou moins persistante des synapses proches non stimulées, un processus connu sous le nom de dépression hétérosynaptique. Cette communication entre synapses stimulées et non stimulées met en jeu l'activation de récepteurs A1 (Manzoni et al. 1994). Récemment, des travaux utilisant le fluorocitrate, un poison métabolique ciblant spécifiquement les cellules gliales, ont révélé que l'adénosine responsable de cette dépression hétérosynaptique était d'origine astrocytaire (Zhang et al. 2003). De plus, l'activation à haute fréquence responsable de ce phénomène augmente le taux de Ca^{2+} intracellulaire dans les astrocytes, phénomène corrélé temporellement avec la dépression hétérosynaptique (Serrano et al. 2006). En accord avec ces résultats, l'injection dans les astrocytes de BAPTA, un agent chélatant le Ca^{2+} , réduit fortement cette communication intersynaptique. Enfin, cette dépression hétérosynaptique est totalement absente des souris transgéniques chez qui la libération vésiculaire astrocytaire est compromise (Pascual et al. 2005).

Bien que l'adénosine soit responsable de la plupart des effets de l'ATP libéré par les astrocytes, une étude a montré que l'ATP pouvait directement modifier la transmission synaptique (Gordon et al. 2005). Dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, la stimulation des astrocytes par la norépinéphrine entraîne la libération d'ATP qui active des récepteurs P2X7 situés sur les neurones paraventriculaires. Ceci conduit à l'activation de la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase, et à l'insertion de récepteurs AMPA à la synapse. Il en résulte une augmentation persistante de la transmission glutamatergique dans cette région du cerveau. L'implication de l'ATP d'origine astrocytaire dans ce phénomène a été établie de deux manières distinctes : dans des conditions où le métabolisme glial est inhibé par le fluorocitrate, et dans des conditions où la couverture astrocytaire des neurones paraventriculaires est réduite, un phénomène physiologique se produisant entre autres chez des animaux déshydratés. Dans ces deux conditions susceptibles de perturber les interactions entre la glie et les neurones

paraventriculaires, la potentialisation de la transmission synaptique induite par l'ATP astrocytaire est fortement, voire totalement compromise.

3.6.3 La taurine.

La taurine est un agoniste des récepteurs glycinergiques, excrétée par les cellules gliales quand celles-ci doivent réguler leur volume cellulaire. Dans le noyau supraoptique de l'hypothalamus, il a été montré qu'un choc hypotonique, suffisant pour induire un gonflement cellulaire des astrocytes, inhibait l'activité des neurones magnocellulaires à ocytocine et à vasopressine. Cette inhibition est sous-tendue par l'activation de récepteurs glycinergiques extrasynaptiques qui hyperpolarisent ces neurones (Hussy et al. 2000). Il est fort probable que cette modulation soit le fait de la taurine libérée par les astrocytes en réponse au choc osmotique comme le suggèrent des expériences d'efflux de taurine tritiée. De plus, l'absence de courants synaptiques glycinergiques dans ces neurones semble indiquer que la taurine, et non la glycine, soit le ligand endogène de ces récepteurs. La taurine gliale serait donc un puissant modulateur de l'activité électrique des neurones supraoptiques, pouvant contrôler la libération d'ocytocine et de vasopressine, deux hormones jouant un rôle prépondérant dans l'homéostasie hydrominérale.

3.6.4 Le GABA.

Dans le bulbe olfactif, une étude récente suggère que les astrocytes libèrent du GABA, le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central adulte. L'activation mécanique des astrocytes induit l'apparition dans les cellules mitrales et granulaires, de courants lents sous-tendus par l'activation de récepteurs GABA-A sensibles à la picrotoxine et à la gabazine. Le GABA astrocytaire ainsi libéré, hyperpolariserait ces neurones, réduisant de la sorte leur activité électrique. Également observée avec le glutamate d'origine glial, cette libération de GABA semble induire des courants sortants simultanément sur les neurones avoisinants, synchronisant ainsi leur activité (Kozlov et al. 2006).

3.6.5 La D-sérine.

La D-sérine est synthétisée et libérée par les cellules gliales en réponse à l'activation de récepteurs glutamatergiques présents sur la membrane de ces cellules. En 1995, Schell et ses collaborateurs ont montré que des astrocytes en culture, préchargés avec de la D-sérine tritiée, libéraient celle-ci consécutivement à l'application de glutamate, de quisqualate, d'AMPA ou de kaïnate (Schell et al. 1995). Ainsi, la libération de D-sérine par les cellules gliales est induite par activation des récepteurs métabotropiques et des récepteurs ionotropiques AMPA et kaïnate (Mothet et al. 2005).

Partie 4 : la D-serine.

Un acide aminé peut exister sous forme libre ou alors être associé à d'autres acides aminés afin de former des peptides ou des protéines. Les acides aminés sont au nombre de vingt et se différencient par leur chaîne latérale. Ce sont des α -aminoacides, car à l'exception de la proline, ils présentent un groupe amine primaire et un groupe acide carboxylique substitués sur le même atome de carbone en position α . Cet atome de carbone α est un centre asymétrique ou centre chiral, car l'arrangement des groupements chimiques qui lui sont liés dans l'espace tridimensionnel peut varier. Cette propriété confère aux acides aminés des propriétés physiques particulières. En effet, les acides aminés possédant un carbone assymétrique, à l'exception de la glycine, sont optiquement actifs : ils dévient la lumière soit vers la gauche soit vers la droite. Les molécules optiquement actives ne sont pas superposables à leur image dans un miroir et constituent des énantiomères. Les acides aminés qui dévient la lumière vers la droite sont du type dextrogyre (d ; du Grec dextro, droite) ; à l'inverse, ceux qui dévient la lumière vers la gauche sont lévogyres (l ; du Grec levo, gauche). Cette stéréospécificité est un aspect fondamental de la biologie. Cette précision est telle qu'il existe des enzymes spécifiques et des récepteurs hautement sélectifs pour ces énantiomères.

4.1 Historique.

Il a longtemps été considéré que les acides aminés libres et protéinogènes néosynthétisés chez les mammifères étaient uniquement présents sous la forme lévogyre. Dès lors, la synthèse métabolique d'acides aminés dextrogyres était, semble-t-il, confinée aux seuls procaryotes. En effet, les bactéries gram-négatives synthétisent à la fois des acides aminés de type l et de type d, acides aminés qui entrent notamment dans la composition des peptidoglycanes de leur paroi cellulaire (Lamzin et al. 1995). Toutefois, différentes études avaient montré la présence d'acides aminés dextrogyres dans différents organes de mammifères ou d'invertébrés (Corrigan and Srinivasan 1966; D'Aniello and Giuditta 1978). Il était alors considéré que les acides aminés de types d trouvés chez les mammifères

provenaient de l'alimentation ou de la contamination des différents organes à la suite d'une dégradation de la paroi cellulaire des micro-organismes dans le système digestif (Lamzin et al., 1995).

Notre vision changea radicalement à partir de 1986, lorsque Dunlop et ses collaborateurs (Dunlop et al. 1986) identifièrent pour la première fois la présence de d-aspartate dans le cerveau de rongeur et dans le sang humain. Six ans plus tard, Hashimoto et ses collègues (Hashimoto et al. 1992) mirent au point une méthode pour séparer les énantiomères présents dans un échantillon biologique en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette technique permit pour la première fois de séparer efficacement et de détecter les énantiomères dans différents organes dont le cerveau de rongeur. Grâce à cette technique, ils confirmèrent la présence de d-aspartate dans le système nerveux et découvrirent également un deuxième acide aminé de type D : la D-sérine. Il est apparu que non seulement cet énantiomère est présent dans le cerveau, mais surtout, il y est présent dans des proportions significatives : Il peut représenter un tiers de la sérine totale dans le cerveau, selon la région analysée (Hashimoto et al. 1992). La présence de D-sérine a également été démontrée en périphérie (Hashimoto and Oka 1997). Le d-aspartate est, quant à lui, très peu représenté dans le système nerveux central : il est surtout très présent dans des organes neuroendocriniens comme les glandes surrénales ou la neurohypophyse (Hashimoto and Oka 1997; Schell et al. 1997).

Cependant, l'existence de ces acides aminés dextrogyres posait le problème de leur fonction et de leur origine. La découverte, notamment de la voie de synthèse et de dégradation de la D-sérine dans le cerveau des mammifères allait rendre à jamais caduque le postulat séculaire de l'absence de métabolisme des acides aminés dextrogyres chez les vertébrés.

4.2 Métabolisme: synthèse.

La synthèse de novo de D-sérine dans le système nerveux central a été suggérée pour la première fois par l'observation de l'accumulation de D-sérine dans le cortex de rats nouveau-nés, consécutivement à l'injection intrapéritonéale de L-

sérine ou de glycine (Takahashi et al. 1997). Le lien métabolique entre ces différents acides aminés a été confirmé par la suite lors d'une étude par microdialyse intracérébrale dans laquelle les auteurs ont observé une élévation de [³H]D-sérine tritiée consécutivement à l'administration de L-sérine et de glycine radioactives (Dunlop and Neidle 1997). L'hypothèse d'une synthèse de novo était ainsi confortée mais l'enzyme responsable de la synthèse de D-sérine demeurait inconnue.

En 1999, la sérine racémase, enzyme responsable de la conversion directe de la L-sérine en D-sérine, fut isolée et purifiée (Wolosker et al. 1999). Il s'agit d'une enzyme de 339 acides aminés (poids moléculaire estimé : 37 kDa) dont l'activité est dépendante d'un cofacteur : le pyridoxal-5'-phosphate. Cette enzyme est le chef de file d'une nouvelle famille de racémases ne possédant que très peu d'homologie avec les racémases bactériennes jusqu'à ce jour identifiées (Schell 2004). Il semble que la sérine racémase ait évolué à partir de l'alanine racémase des procaryotes et de la sérine déshydratase ((Wolosker et al. 1999), enzymes avec lesquelles elle possède une homologie partielle (28-38%) de séquences dans sa partie N terminale. La sérine racémase possède des propriétés particulières :

c'est une enzyme bi-fonctionnelle ;

elle catalyse la racémisation de la L-sérine en D-sérine;

elle possède également une activité d'élimination α,β de déshydratation pour produire du pyruvate à partir de la L-sérine (Foltyn et al. 2005).

Ainsi, à partir de quatre molécules de L-sérine sont synthétisées une molécule de D-sérine et trois molécules de pyruvate (Figure 21)(De Miranda et al. 2002). La synthèse de pyruvate par la sérine racémase relie donc la synthèse de D-sérine au métabolisme énergétique (Martineau et al. 2006). En plus du pyridoxal-5'-phosphate, cette enzyme requiert également comme cofacteur l'ATP, le magnésium (De Miranda et al. 2002) et le calcium (Cook et al. 2002). En revanche, elle est modulée négativement par la glycine et des molécules dérivées de l'acide L-aspartique (L-aspartate, acide L-homocystéique, L-glutamate et le L-asparagine (Dunlop and Neidle 2005)).

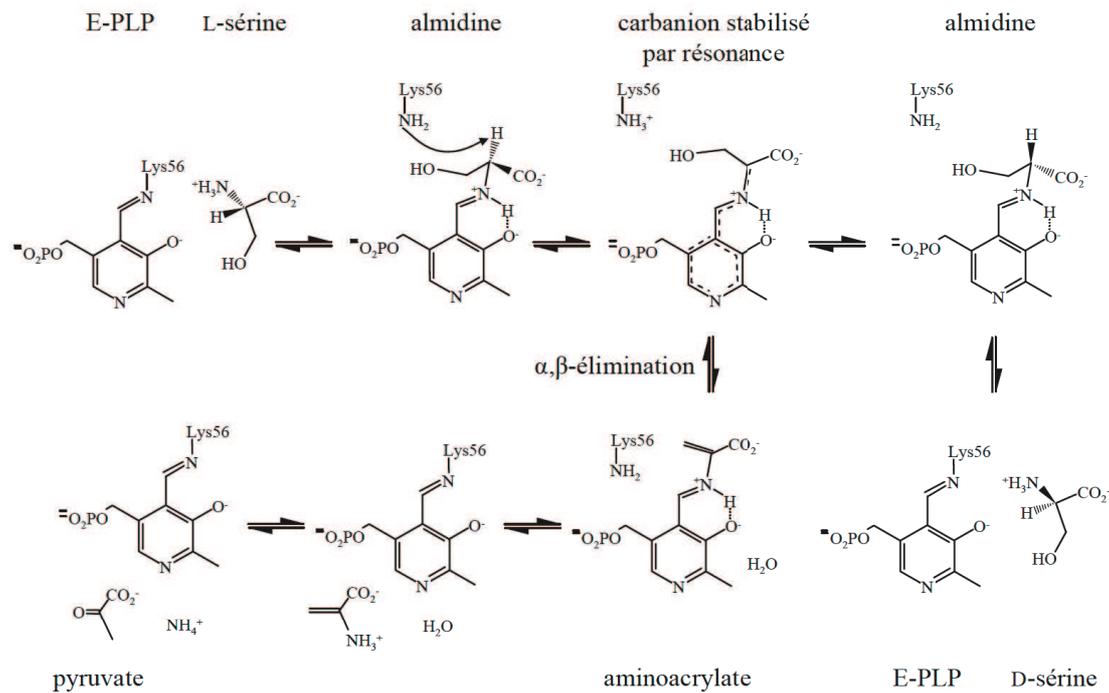


Figure 21 : Réactions de racémisation et d' α,β -élimination par la sérine racémase. La sérine racémase (E) associée à son co-enzyme, le pyridoxal-5'-phosphate (PLP), catalyse la production d'un carbanion intermédiaire à partir duquel deux réactions peuvent avoir lieu. Soit une réaction de racémisation dont le produit est la D-sérine, soit une réaction d' α,β -élimination où les produits sont le pyruvate et l'ion ammonium (Foltyn et al. 2005).

Enfin, il existe un dernier étage de régulation de cette enzyme, représenté par des interactions de la sérine racémase avec différentes protéines. Ainsi, il a été montré que la partie C-terminale de la sérine racémase interagissait avec les domaines d'interaction protéiques " PDZ " de la protéine GRIP (" glutamate receptor interacting protein "), une protéine ancrée au récepteurs AMPA (Kim et al. 2005). La transfection de GRIP dans des cellules HEK293 exprimant la sérine racémase augmente son activité et la production de D-sérine (Kim et al. 2005). Plus récemment, il a été proposé que l'activation des récepteurs AMPA pourrait également entraîner la liaison de PICK1 à la sérine racémase, modulant ainsi positivement la production de D-sérine (Fujii et al. 2006).

4.3 Métabolisme : catabolisme.

La voie de dégradation de la D-sérine demeure, quant à elle, moins connue. Un nombre croissant de travaux supporte l'hypothèse selon laquelle, une enzyme

peroxysomale, la D-amino acide oxydase (DAAO) serait responsable du catabolisme de la D-sérine (Figure 22). La DAAO, enzyme découverte par Krebs en 1935 (Krebs 1935) est une flavoprotéine qui catalyse la déamination oxydative des acides aminés de forme D, à l'exception du D-aspartate, en α -cétoacide correspondant. Toutefois, le rôle de cette enzyme, abondante dans le système nerveux et différents organes des mammifères, a longtemps été ignoré jusqu'à la découverte de la D-sérine. En fait, cette enzyme pourrait contrôler les taux de D-sérine ambiants dans certaines régions du système nerveux central. En effet, Konno et ses collaborateurs ont identifié une lignée de souris dans laquelle l'activité de la DAAO est absente (Konno and Yasumura 1983; Konno et al. 1988; Sasaki et al. 1992). Cette perte de fonction se traduit, chez les animaux déficients, par une augmentation importante de la concentration de D-sérine dans le cervelet et le tronc cérébral, régions où normalement les taux de D-sérine sont à peine détectables chez l'adulte (Nagata 1992). Ces observations corroborent des études réalisées au cours du développement postnatal, et qui montrent que la distribution et les taux de D-sérine sont inversement reliés aux niveaux d'expression et d'activité de la DAAO dans les différentes régions du cerveau de rongeur (Schell et al. 1995; Wang and Zhu 2003; Puyal et al. 2006). Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que l'inhibition pharmacologique par la chlorpromazine de la DAAO conduisait à une élévation des taux de D-sérine ambiants (Park et al. 2006).

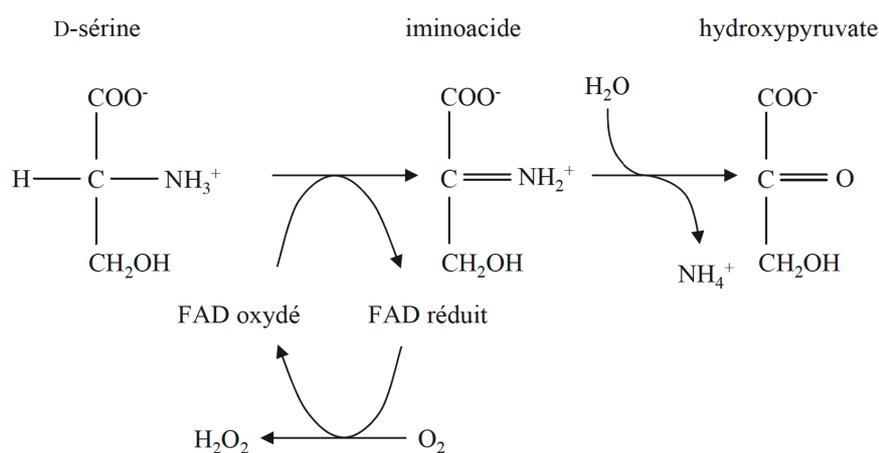


Figure 22 : Dégradation enzymatique de la D-sérine par la D-amino acide oxydase. La D-amino acide oxydase associée à son co-enzyme, la flavine adénine nucléotide (FAD), catalyse la production d'un iminoacide intermédiaire à partir duquel une oxydation produit l' α -cétoacide correspondant : l'hydroxypyruvate (Pollegioni et al. 2007).

Toutefois, l'analyse des animaux mutants pour la DAAO a révélé que les taux de D-sérine étaient inchangés dans le cortex et l'hippocampe (Nagata 1992; Hamase et al. 2005). Ces données suggèrent donc que dans ces structures, la DAAO ne serait pas l'enzyme responsable de la dégradation de la D-sérine (Hamase et al. 2005). Dans ces régions, la sérine racémase, pourrait contrôler les niveaux de D-sérine via son activité de α,β -élimination d'une molécule d'eau à partir de cet acide aminé (Foltyn et al. 2005).

4.5 Distribution.

Différentes études d'immunomarquages et d'analyses par HPLC ont révélé une distribution régionalisée de la D-sérine dans le système nerveux central (Figure 23). Au début du développement, la D-sérine est fortement exprimée dans le télencéphale, le diencephale et le cervelet (Kumashiro et al. 1995). Au cours de la troisième semaine postnatale, la concentration en D-sérine dans le cervelet et les noyaux vestibulaires diminue parallèlement à l'augmentation de l'expression de la DAAO (Wang and Zhu 2003). De ce fait, chez le rat adulte, la D-sérine est fortement exprimée dans la rétine, le cortex cérébral, l'hippocampe, le thalamus, le striatum, les structures olfactives, alors qu'elle est présente à l'état de trace dans le tronc cérébral et le cervelet (Schell et al. 1995; Schell et al. 1997).

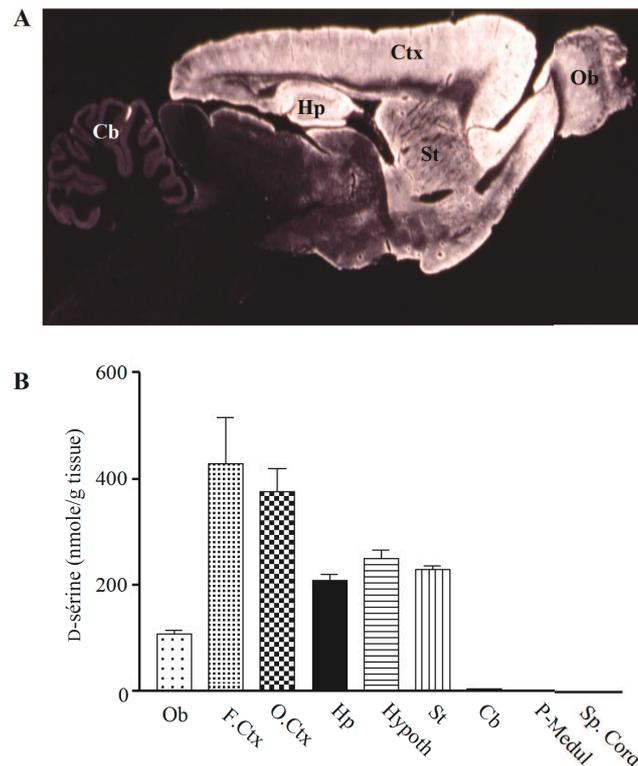


Figure 23 : Distribution de la D-sérine dans le système nerveux central adulte. A. immunohistochimie de la D-sérine. Ctx : cortex, Hp : hippocampe, Ob : bulbe olfactif, St : striatum, Cb : cervelet. B. Taux de D-sérine mesurés par HPLC dans différentes régions. F. Ctx : cortex frontal, O. Ctx : cortex occipital, Hypoth : hypothalamus, P-medul : tronc cérébral, Sp. Cord : moelle épinière (Martineau et al. 2006).

Des analyses de la distribution subcellulaire de la D-sérine ont montré que cet acide aminé atypique était majoritairement présent dans une sous-population de cellules gliales du système nerveux central : les astrocytes (Schell et al. 1995; Puyal et al. 2006). De plus, cette cartographie cellulaire correspond également à la distribution des enzymes de son métabolisme, la sérine racémase (Schell et al. 1995; Wolosker et al. 1999) et la DAAO (Horiike et al. 1994; Park et al. 2006).

Des études récentes ont montré que la D-sérine était également présente et métabolisée dans les cellules microgliales (Wu et al. 2004) et dans les cellules de Schwann (Wu et al. 2004).

4.6 Régulation de la transmission et de la plasticité synaptique.

Au cours de leurs expériences menées en 1988, Kleckner et Dingledine ont montré que l'application de D-sérine mimait les effets potentialisateurs de la glycine

sur les réponses NMDA. À la même époque, il avait été remarqué que la diminution de l'amplitude des réponses NMDA, observée lors de la perfusion rapide de cultures d'hippocampe, était contrecarrée par l'application d'un milieu d'origine astrocytaire. Cette étude suggérait donc l'implication d'un facteur d'origine gliale dans la modulation des réponses NMDA (Forsythe et al. 1988). Aujourd'hui, nous pouvons faire le lien entre ces deux études car il a été établi que la D-sérine était synthétisée et libérée par les astrocytes (Schell et al. 1995; Wolosker et al. 1999). D'autre part, le lien qui unit la D-sérine à l'activation des récepteurs NMDA est renforcé par l'observation que la D-sérine est présente dans les régions du cerveau enrichies en récepteurs NMDA composés des sous-unités NR2A ou NR2B (Hashimoto et al. 1992; Schell et al. 1997).

La démonstration du rôle de la glycine dans la modulation allostérique de l'activité des récepteurs NMDA est uniquement fondée sur des applications exogènes de cet acide aminé (Johnson and Ascher 1987) et repose sur la présence de concentrations saturantes de glycine dans le milieu extracellulaire (Bergeron et al. 1998). En effet, la concentration de glycine dans le milieu extracellulaire est d'environ 1 μ M, donc supérieure à l'EC₅₀ de 100-300 nM du site glycine des récepteurs NMDA. Cependant, il apparaît qu'au niveau de la synapse, les taux ambiants de glycine puissent être bien inférieurs du fait de la présence d'un système de recapture extrêmement efficace (Supplisson and Bergman 1997). En accord avec cette hypothèse, certaines études ont pu montrer que l'inhibition sélective des transporteurs à la glycine augmentait les réponses NMDA (Bergeron et al. 1998), mais l'interprétation de ces études, quant au rôle de la glycine endogène dans la régulation des récepteurs NMDA, reste cependant très limitée.

A l'inverse de la glycine, le rôle de la D-sérine endogène dans la régulation des récepteurs NMDA s'appuie sur des données expérimentales plus convaincantes. Ainsi, le groupe de Snyder a étudié les conséquences de la dégradation spécifique de la D-sérine sur l'activité des récepteurs NMDA (Mothet et al. 2000). Pour cela, les auteurs ont utilisé la D-amino acid oxydase (DAAO), une enzyme catalysant la dégradation de la D-sérine sans affecter la glycine. Ces expériences réalisées sur des cultures d'hippocampe, ont démontré que les réponses NMDA étaient fortement

diminuées par la dégradation de la D-sérine endogène avec la DAAO. Ce travail a révélé, pour la première fois, que la D-sérine était un ligand endogène des récepteurs NMDA. Ces résultats ont pu être reproduits par d'autres groupes (Yang et al. 2003) et dans d'autres structures comme la rétine (Stevens et al. 2003). Une preuve supplémentaire de l'implication de la D-sérine endogène dans la modulation des réponses NMDA est venue de l'étude des souris déficientes en DAAO (Wake et al. 2001). Chez ces animaux, un taux élevé de D-sérine a été mesuré dans la moelle épinière et comme on pouvait s'y attendre, les réponses NMDA enregistrées dans cette région sont fortement potentialisées.

En régulant l'activation des récepteurs NMDA, la D-sérine devrait également influencer la plasticité synaptique à long terme. En accord avec cette hypothèse, il a été rapporté que la dégradation de la D-sérine par la DAAO, en plus d'inhiber les réponses NMDA, perturbait fortement dans l'hippocampe, l'induction de la LTP enregistrée dans la région CA1, consécutivement à l'activation des collatérales de Schaffer (Yang et al. 2003).

Toutes ces données indiquent que la D-sérine est un des ligands endogènes des récepteurs NMDA. La D-sérine, synthétisée par les cellules gliales, pourrait donc participer au transfert de l'information, alimentant ainsi le concept de synapse tripartite.

4.7 D-sérine et pathologies.

La D-sérine est un acide aminé synthétisé au niveau cérébral par la sérine racémase et dégradé par la D-amino acide oxydase. Cet acide aminé fait partie intégrante de processus physiologique complexe comme co-agoniste du récepteur NMDA. Toute dérégulation de ces voies physiologiques a pour conséquences le développement de pathologies. La D-sérine est impliquée dans plusieurs pathologies ayant des conséquences dramatiques, voire avec un pronostic vital engagé. En effet, en fonction de la concentration extracellulaire de D-sérine, les conséquences vont être radicalement différentes.

L'ischémie cérébrale est une diminution de l'apport sanguin pouvant avoir pour origine un caillot sanguin obstruant une artère ou une plaque d'athérome. Cette diminution de l'apport sanguin a, pour principale conséquence, une diminution de l'apport en oxygène. Cette diminution peut laisser des séquelles irréversibles et conduire à l'infarctus de l'organe. En 2009, Kirschner et ses collaborateurs ont démontré que la privation en oxygène sur des tranches d'hippocampe, a pour effet de multiplier par 2,5 les taux extracellulaires de D-sérine et de L-glutamine (Kirschner et al. 2009). Cette forte augmentation a pour principale conséquence, l'excitotoxicité et entraîne une augmentation de la mort cellulaire (Mustafa et al. 2010). Par ailleurs, Mustafa et ses collaborateurs ont démontré que l'inactivation du gène de la sérine racémase confère un effet protecteur vis à vis de l'ischémie et de l'excitotoxicité, en diminuant la mort cellulaire (Mustafa et al. 2010). Ces résultats mettent en avant le rôle délétère de la D-sérine, lorsque son taux extracellulaire est trop élevé. Des résultats équivalents ont été retrouvés pour d'autres pathologies où les taux extracellulaires de D-sérine sont augmentés. En effet, la sclérose latérale amyotrophique est une neuropathie dont 5% sont d'origine familiale. Ces dernières ont permis de mettre en évidence certains gènes directement responsables de cette pathologie. La DAAO est mise en avant dans ces formes familiales, une diminution drastique de l'activité de l'enzyme est détectée chez ces patients, qui a pour résultante une accumulation de D-sérine au niveau de la moelle épinière (Mitchell et al. 2010) et une augmentation de la mort cellulaire. L'ensemble de ces résultats met en avant le rôle majeur de la concentration extracellulaire de D-sérine qui, lorsqu'elle est trop élevée, devient pathologique mais, comme nous allons le voir, des résultats similaires sont observés lorsque les taux sont trop faibles.

L'hypofonction du récepteur NMDA est de plus en plus considéré comme la cause majeure de la schizophrénie (voir chapitre NMDA et schizophrénie). Comme nous l'avons mentionné précédemment, la D-sérine est ligand endogène du récepteur NMDA dans de nombreuses structures. Ces évidences ont entraîné l'intérêt croissant des recherches pour cet acide aminé. Les premiers essais cliniques réalisés ont porté sur l'adjonction de glycine (Javitt et al. 1994; Heresco-Levy et al. 1996) ou de D-cyclosérine (Goff et al. 1995; van Berckel et al. 1996) en complément des

neuroleptiques classiques. Les résultats sont se révélés encourageants, puisque ces molécules améliorent les symptômes négatifs alors que les neuroleptiques n'avaient que peu ou pas d'effets. Toutefois, la découverte du rôle de la D-sérine a permis de conduire de nouvelles études qui se sont révélées encore plus prometteuses. La première étude clinique de ce type fut réalisée en 1998 par l'équipe du Dr Coyle (Tsai et al. 1998), les patients reçurent de la D-sérine en complément des neuroleptiques. Cette double médication eut pour effet, une amélioration des symptômes positifs, négatifs et cognitifs, supérieure à celle enregistrée par le simple apport de glycine ou de D-cyclosérine et fut une avancée considérable dans la prise en charge des patients schizophrènes. Par la suite, ces résultats furent confirmés par une deuxième étude clinique où l'adjonction de D-sérine fut cette fois-ci associée avec des neuroleptiques de seconde génération comme le rispéridone (Heresco-Levy et al. 2005).

Ces recherches ont entraîné l'étude plus poussée des différents paramètres de la D-sérine ainsi que sa voie métabolique. En 2003, Hashimoto et ses collaborateurs ont mesuré les taux de D-sérine dans le sérum de 42 patients sains et de 42 patients atteints de la schizophrénie (Hashimoto et al. 2003). Les taux de D-sérine sont diminués de 20 % pour les patients schizophrènes alors que les taux de L-sérine sont augmentés de 15 %. Ces résultats suggèrent une diminution de l'activité de la sérine racémase, l'enzyme de synthèse de la D-sérine, puisque la L-sérine s'accumule dans les tissus alors que la D-sérine diminue. La D-sérine passant la barrière hémato-encéphalique, ce groupe a mesuré les taux de D-sérine et de L-sérine à partir du liquide cérébro-spinal (Hashimoto et al. 2005). les auteurs constatèrent que le ratio D-serine/ (D-sérine + L-sérine) est diminué de 20%, alors que les taux de L-sérine et de D-sérine ne sont pas modifiés. Finalement, en 2007, Bendikov et ses collaborateurs démontrèrent au cours d'une étude post-mortem dans une cohorte de 15 patients sains et 15 patients schizophrènes, une diminution de 25 % des taux de D-sérine et du ratio D-serine/ (D-sérine + L-sérine) (Bendikov et al. 2007). Ces différences de résultats entre les deux études peuvent s'expliquer par des différences au niveau des cohortes. En effet, la cohorte utilisée par Hashimoto est très homogène, puisqu'il y a uniquement des hommes caucasiens, par opposition

Bendikov présente une cohorte plus hétérogène avec un mélange femmes et hommes et des origines caucasiennes et africaines. De plus, Bendikov a démontré que la diminution des taux de D-sérine est retrouvée uniquement pour les femmes (Bendikov et al. 2007). Cette diminution pourrait avoir pour origine une augmentation de l'activité de son enzyme de dégradation, la DAAO. Cette hypothèse repose sur une étude post-mortem effectuée en 2008, qui a clairement démontré que la cohorte de patients schizophrènes présente une augmentation de 300 % de l'activité de l'enzyme (Madeira et al. 2008). Pour confirmer ces résultats, les auteurs ont mesuré l'activité de la DAAO pour des patients atteints d'autres troubles psychiatriques comme les troubles bipolaires ou la dépression (Madeira et al. 2008). Au cours de cette étude, aucune augmentation de l'activité de la DAAO n'a été mesurée confirmant la spécificité de l'augmentation de l'activité de la DAAO chez les patients schizophrènes.

La découverte de l'hypofonction du récepteur NMDA grâce à l'utilisation de molécules comme la phencyclidine, associé à la diminution des taux de D-sérine chez les patients schizophrènes sont les clefs de voutes de l'hypothèse glutamatergique. Ces recherches ont permis de recentrer le débat sur cette hypothèse. Toutefois, l'hypothèse glutamatergique ne peut, à elle seule, expliquer l'étiologie de la schizophrénie. Comment réconcilier donc, ces différentes hypothèses?

Hypothèse de travail et objectifs.

L'ensemble des données récemment accumulées sur la régulation par la D-sérine de l'activité des récepteurs NMDA, l'implication de ses enzymes dans la schizophrénie et l'effet thérapeutique de la D-sérine, nous conduisent aujourd'hui à nous interroger sur l'implication possible de la D-sérine et notamment des astrocytes dans la régulation des interactions entre systèmes dopaminergiques et glutamatergiques dans le cortex préfrontal du rongeur. Si, à ce jour, il a été clairement établi que la D-sérine est le co-agoniste endogène des récepteurs NMDA synaptiques dans l'hippocampe et l'hypothalamus, les fonctions de cet acide aminé dans le cortex préfrontal n'ont pas été caractérisées.

Notre hypothèse de travail (Figure 24) implique que les astrocytes pourraient libérer la D-sérine en réponse à une stimulation dopaminergique et ainsi modifier l'activité des neurones glutamatergiques. À l'inverse, nous savons que des afférences glutamatergiques peuvent moduler l'activité des neurones dopaminergiques. Il est tout à fait plausible que cette modulation implique une libération gliale de D-sérine au niveau des récepteurs NMDA présents sur les terminaisons dopaminergiques.

Le principal objectif de ce travail de thèse vise d'une part, à intégrer la D-sérine et son métabolisme dans le fonctionnement de la micro-circuiterie cérébrale et donc dans la physiopathologie de la schizophrénie. D'autre part, il vise à déplacer la vision neurocentrique actuelle de la schizophrénie telle que Lewis et Gonzales-Burgos l'ont décrite (Figure 24)(Lewis and Gonzalez-Burgos 2006) vers un modèle incluant les astrocytes comme des éléments clés de la physiopathologie cérébrale.

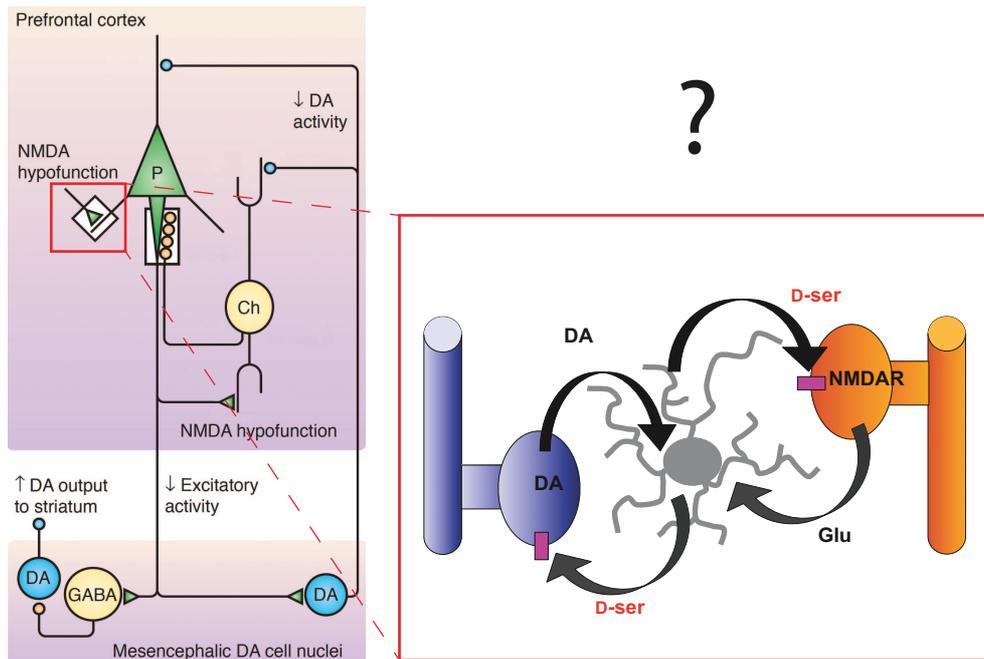


Figure 24 : Schéma des hypothèses de travail. L'hypofonction du récepteur NMDA entraîne un déficit d'activation des neurones pyramidaux qui projettent au niveau du mésencéphale sur des neurones dopaminergiques et GABAergiques. Les neurones GABAergiques et dopaminergiques sont donc moins actifs, il en résulte respectivement une hyperdopaminergie striatal et une hypodopaminergie au niveau du PFC. Notre hypothèse est que la dopamine module l'activité des récepteurs NMDA via la D-sérine

1. Plus précisément, nos objectifs sont de :
2. Déterminer le rôle respectif de co-agonistes des récepteurs NMDA de la D-sérine et de la glycine dans le cortex préfrontal du rongeur adulte. Et par conséquent, le rôle de ces acides aminés dans la transmission synaptique excitatrice ainsi que dans la plasticité synaptique à long terme ;
3. Éclaircir le rôle éventuel des astrocytes dans la transmission et la plasticité des synapses glutamatergiques ;
4. Caractériser le rôle de la D-sérine dans la modulation par la dopamine de la transmission glutamatergique et de l'excitabilité des neurones pyramidaux du cortex préfrontal ;
5. Mettre en évidence la présence de récepteurs fonctionnels dopaminergiques à la surface des astrocytes qui gouvernent ou modulent la libération de D-sérine, et dont l'activation, par conséquent, affecte la transmission glutamatergique.

6. Définir le rôle des astrocytes dans la modulation par le système dopaminergique de la transmission glutamatergique ?
7. Démontrer la présence de récepteurs dopaminergiques fonctionnels à la surface des astrocytes du PFC qui pourraient conditionner la libération de D-sérine?

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Ce travail de thèse a été réalisé en utilisant deux types de préparation : une préparation de tranches aiguës de cortex préfrontal et un modèle d'astrocytes corticaux de rat en culture primaire.

1. Electrophysiologie.

Les études électrophysiologiques ont été réalisées sur des tranches de cortex préfrontal de rats mâles Wistars âgés de 60 à 90 jours. Le rat a été choisi car c'est un modèle expérimental très documenté en particulier du point de vue anatomique, et qui permet d'accéder relativement facilement aux réseaux neuronaux. La tranche d'âge des animaux utilisés, permet de limiter les variations liées à la maturation tardive des synapses, correspond à une période où le cerveau est mature.

L'étude *in vitro* sur tranche permet de conserver intacte une grande partie des réseaux neuronaux tout en enregistrant spécifiquement un neurone. Elle permet aussi de réduire considérablement les fluctuations dues à l'activité spontanée par rapport au modèle *in vivo*.

1.1 Animaux et conditions d'anesthésie.

Les rats de souche Wistar proviennent de l'animalerie de l'Institut François Magendie. Les animaux étaient placés dans des cages collectives avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Le jour de l'expérimentation, les animaux sont anesthésiés avec un anesthésique gazeux constitué d'un mélange d'isofluorane (Forène, 5%) et d'oxygène (100%) pendant une minute, avant d'être décapités avec une guillotine.

1.2 Préparation des tranches aiguës de cortex préfrontal.

Après décapitation, le cerveau est rapidement prélevé et plongé dans une solution d'aCSF (artificial cerebrospinal fluid) oxygénée (95% O₂, 5% CO₂) maintenue à 4°C. La composition de l'aCSF (en mM) est la suivante : NaCl 123 ; KCl 2,5 ; Na₂HPO₄ 1 ; NaHCO₃ 26,2 ; MgCl₂ 1,3 ; CaCl₂ 2,5 et glucose 10 (pH 7,3-7,4 ;

295 mosmol.kg⁻¹). Les méninges sont enlevées. Des tranches de 300 µm du cortex préfrontal sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT1200S) avant d'être incubées à 31°C dans le milieu extracellulaire oxygéné pendant 45 min (Figure 25). Les tranches sont ensuite placées à température ambiante pendant au moins une heure avant le début des enregistrements.

Les tranches de cortex sont ensuite placées dans une chambre à immersion et sont maintenues à une température 30°C. Elles sont maintenues en place par une grille de platine et sont constamment perfusées par le milieu extracellulaire oxygéné. Les tranches sont visualisées à l'aide d'un microscope droit à immersion (BX51WI, Olympus) en utilisant des objectifs à immersion à eau. Le cortex préfrontal et les différentes couches corticales sont identifiés à un grossissement de 400x à l'aide d'une caméra vidéo infrarouge (Sony XCST70CE).

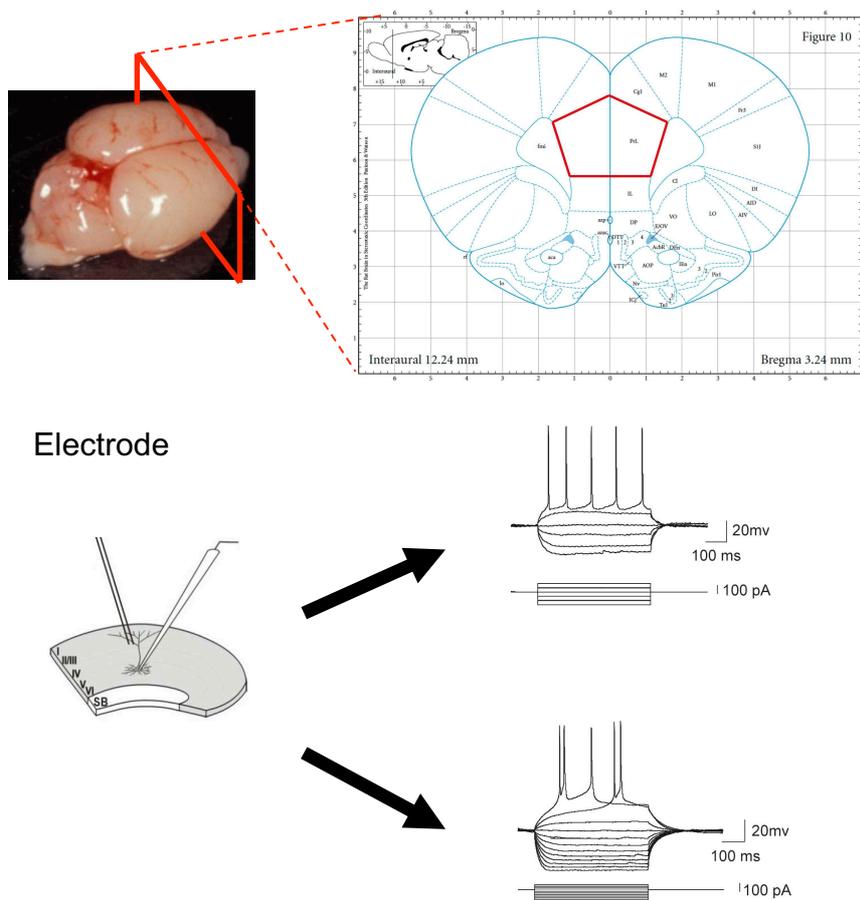


Figure 25 : Représentation du plan de coupe et de l'aire cérébrale où sont enregistrés les neurones pyramidaux. L'électrode de stimulation est placée dans les couches I/III et l'enregistrement des neurones pyramidaux s'effectue dans les couches V/VII.

1.3 Enregistrements électrophysiologiques.

1.3.1 Principe général.

Les enregistrements sont réalisés par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière qui permet l'enregistrement des courants globaux résultant de l'activité de l'ensemble des canaux membranaires. Les électrodes de patch sont obtenues par étirement de capillaires de verre borosilicaté sans filament de 1,2 mm de diamètre externe et de 0,6 mm de diamètre interne (Harcord Apparatus) à l'aide d'une étireuse verticale Narishige PP-83 (Scientific Instrument Lab) préalablement étalonnées. Ces électrodes possèdent des extrémités d'un diamètre de 1 à 2 μm afin de permettre l'établissement d'une jonction serrée avec la membrane neuronale. Les électrodes sont remplies du milieu intrapipette préalablement filtré. Les électrodes de patch ont alors une résistance de 3 à 5 $\text{M}\Omega$ dans le milieu extracellulaire. La résistance est mesurée par application de sauts rectangulaires de potentiel de 20 mV et de 100 ms de durée à une fréquence de 50 Hz. La résistance d'accès de l'électrode est mesurée tout au long de l'expérience grâce au logiciel pClamp10.

L'électrode de patch est approchée du neurone à l'aide d'un micromanipulateur piézoélectrique, une pression d'air positive est appliquée à l'intérieur de l'électrode de patch afin de dégager la surface du neurone cible. Après contact entre l'électrode de patch et la cellule cible, la pression positive est coupée ce qui provoque l'adhésion de la membrane sur l'électrode de verre entraînant une augmentation de la résistance d'accès de l'électrode (visualisée sur l'oscilloscope). Une pression négative légère est alors exercée afin d'obtenir une jonction serrée entre électrode et membrane neuronale, la résistance de l'électrode est alors maximale, de l'ordre de plusieurs $\text{G}\Omega$ (le créneau de courant sur l'oscilloscope est quasi nul). Une fois la jonction serrée établie, le passage en configuration cellule entière est réalisé par application d'une pression négative forte et brève (environ 1 bar pendant 1 s) pour rompre la portion de membrane située sous l'électrode (Figure 26). Le passage en configuration cellule entière se traduit par l'apparition d'un courant capacitif (en réponse au créneau de potentiel imposé) qui traduit les phénomènes de charge et de décharge de la capacité membranaire.

Après quelques minutes, le neurone enregistré se trouve complètement dialysé par le milieu intrapipette. Le patch est réalisé au niveau du soma d'un neurone pyramidal des couches V/VI du PFC. Cette technique de patch permet d'enregistrer les courants transmembranaires générés au niveau du soma et de la partie proximale des dendrites. Cependant, comme tous les enregistrements somatiques, nos enregistrements ne peuvent être des estimations rigoureuses des événements synaptiques ayant lieu au niveau distal des dendrites à cause du problème de « space-clamp ». Ce problème résulte essentiellement du fait que la cellule n'est pas électriquement compacte. Ainsi, la fuite ohmique liée à la résistance axiale des neurites produit un décalage relativement proportionnel à la distance synapse/soma, dans la mesure du potentiel d'inversion synaptique (Spruston et al. 1994). En nous plaçant en configuration cellule entière au niveau somatique, il n'est donc pas techniquement possible de connaître la valeur exacte du potentiel imposé au niveau de la partie distale des dendrites. Toutefois, nos enregistrements rendent compte de l'intégration dendritique normale et représentent les variations relatives des changements de conductance au niveau somatique (Haider et al., 2006).

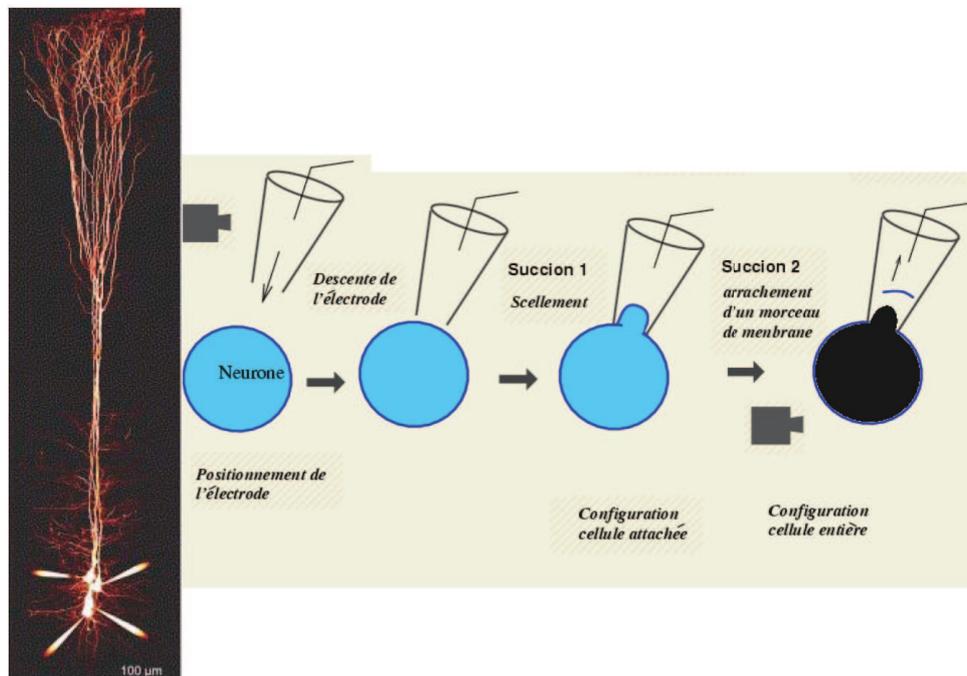


Figure 26 : Principe général du patch-clamp. L'électrode d'enregistrement est approchée jusqu'à entrer en contact étroit avec la membrane de la cellule. Lorsque le contact est établi, une brève succion est appliquée afin de casser la membrane sous la pipette.

1.3.2 Acquisition.

Les signaux membranaires sont enregistrés en mode potentiel imposé ou en mode courant imposé à l'aide d'un amplificateur Multiclamp 700B (Axon Instruments, Inc.) et analysés en temps réel grâce à l'utilisation du logiciel pClamp10 (Axon Instruments, Inc.). Les signaux étaient filtrés à 2kHz, échantillonnés et numérisés à 5 kHz à l'aide d'une interface Digidata 1440A (Axon Instruments, Inc.). Tout au long de l'enregistrement, la résistance en série (R_s) était mesurée (6-15 M Ω) et les cellules étaient exclues de l'analyse si la résistance d'accès (R_a) est > 25 M Ω ou si plus de 20% de changements avaient lieu au cours de l'expérience dans R_s et R_a .

1.3.3 Enregistrements en mode voltage imposé.

Le deuxième protocole utilisé au cours de nos expériences permet l'enregistrement en mode potentiel imposé des réponses en courant des neurones pyramidaux suite à la stimulation électrique d'une couche corticale (couche I/II). Les stimulations électriques sont réalisées à l'aide d'électrodes de verre remplies avec le milieu extracellulaire. La stimulation électrique est induite par le programme qui commande le déclenchement de la stimulation. Au cours de nos expériences, l'intensité de la stimulation est réglée afin d'enregistrer une réponse infraliminaire, ne présentant pas de potentiel d'action.

Chaque tranche est placée dans la chambre d'enregistrement où elle est continuellement perfusée (1-2 ml/min) à température ambiante (30°C) avec l'aCSF oxygénée (95% O₂, 5% CO₂), supplémentée de picrotoxine (50 μ M), un antagoniste des récepteurs GABA-A. Les neurones pyramidaux sont identifiés visuellement grâce à un microscope à contraste d'interférence différentielle (microscope Olympus BX50WI), avec illumination infrarouge, relié à une caméra vidéo (Sony XCST70CF).

Les courants synaptiques postsynaptiques excitateurs (EPSCs) mesurés en mode potentiel imposé au niveau des neurones pyramidaux dans les couches V/VI sont évoqués grâce à des stimulations des couches I/II. Les courants AMPA, évoqués à une fréquence de 0.066 Hz sont enregistrés à un potentiel de -60 mV, un potentiel où les courants NMDA sont bloqués par les ions Mg²⁺. Les courants NMDA, évoqués à 0.033Hz (toutes les 30 secondes) sont isolés dans un second

temps à +40 mV en présence de NBQX (10 μ M), un antagoniste des récepteurs du glutamate de type AMPA/kainate. Le rapport AMPA/NMDA exprimé dans cette étude correspond au rapport de l'amplitude au pic du courant AMPA sur celui du courant NMDA. Dans ce cas, les électrodes d'enregistrement ont une résistance de 2.5-5 M Ω et sont remplies du milieu intracellulaire contenant (mM) : CsCl, 130 ; NaCl, 10 ; HEPES, 10 ; QX-314, 5 ; EGTA, 1 and CaCl₂, 0.1 (ajusté à pH 7.1-7.3 avec du CsOH ; 292-296 mOsm.kg⁻¹). Le QX-314 est un dérivé quaternaire de la lidocaïne. Il permet de bloquer certaines conductances sodiques et potassiques comme celles activées par le récepteur au GABA de type B (Nathan et al., 1990) et c'est pour bloquer ce récepteur qu'il est ajouté au milieu intrapipette. Le QX-314 augmente la constante de temps de la membrane des neurones.

1.3.4 Enregistrements en mode courant imposé.

Pour chaque cellule en mode courant imposé, la résistance d'entrée, le potentiel de repos de la membrane, le nombre de potentiel d'action ainsi que le délai avant l'apparition du premier potentiel d'action, ont été mesurés avant et après l'application de la drogue suite à l'injection d'un courant dépolarisant d'une durée de 1s. Typiquement, les cellules après avoir été patchées sont laissées au repos pendant 5 min. Suite à cela, le protocole de stimulation est appliqué 3 fois avant l'application de la drogue. La drogue est appliquée en bain pendant 10 min, à la suite de quoi le même protocole de stimulation est appliqué 3 fois. Finalement, le lavage de la drogue est effectué pendant au minimum 20 min avec de l'aCSF. Dans ces conditions, le milieu intracellulaire de l'électrode d'enregistrement est composé de (en mM) : K-gluconate, 120; KCl, 20; HEPES, 10, EGTA, 1; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.1 (ajusté à pH= 7.2-7.4; 290 \pm 5 mOsm.Kg⁻¹).

1.3.5 Expériences de potentialisation à long terme.

Une fois le passage en configuration « cellule entière » réalisé, les courants postsynaptiques excitateurs (EPSCs) étaient enregistrés au niveau des neurones pyramidaux des couches V/VI pendant une période contrôle de 5-10 minutes au cours de laquelle leur amplitude devait être stable. Ensuite, le protocole de

stimulation était appliqué puis les EPSCs enregistrés pendant une période d'au moins 25 minutes. La potentialisation à long terme (LTP) était induite dans les 15 minutes suivant le passage en configuration cellule entière. En effet, l'induction de la LTP dépendant des récepteurs NMDA est fortement perturbée, voire impossible après 15 minutes de dialyse de la cellule par la solution intracellulaire (Malinow & Tsien, 1990). Le mécanisme responsable de cette perturbation demeure inconnu. La LTP est induite par 4 stimulations de 1 sec des afférences dans les couches I/II à 15 secondes d'intervalle avec un train de stimulation à 100 Hz pendant une seconde en mode courant imposé ($I=0$). Dans ce cas, la composition de la solution intracellulaire était la suivante (en mM) : K-gluconate, 120; KCl, 20; HEPES, 10, EGTA, 1; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 0.1 (ajusté à $pH= 7.2-7.4$; 290 ± 5 mOsm.Kg⁻¹) afin de permettre le maintien de la cellule enregistrée à son potentiel de repos pendant le protocole d'induction de la LTP.

2. Culture cellulaire.

Les cultures primaires d'astrocytes sont préparées à partir du cortex de rats nouveaux-nés (entre 0 et 4 jours) de souche Wistar. Le protocole est inspiré de deux publications (Levison et McCarthy, 1991 ; Schell et al. 1995). Les rates en gestation proviennent de l'animalerie de l'Institut ou d'une source commerciale (Centre d'élevage Janvier). Les rats nouveaux-nés ont été séparés de leur mère le jour de l'expérimentation. Après décapitation, les cerveaux des rats sont rapidement prélevés et plongés dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, Invitrogen) à 4°C contenant 6 g/l de glucose. Les cortex sont ensuite isolés et rincés dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS, Invitrogen) contenant 1 mM HEPES, 100 µg/ml streptomycine et 100 U/ml pénicilline. La dissociation des cellules est ensuite réalisée par incubation pendant 15 minutes à 37°C sous forte agitation (300 rpm) avec de la trypsine (0,25 % dans du HBSS) contenant 1 mg/ml de DNase I (Roche Diagnostic). Ensuite, seules les cellules en suspension sont récupérées, ajoutées à un volume identique de milieu de culture froid (4°C) composé de milieu essentiel minimum (MEM, Invitrogen) complété avec 10 % sérum de veau foetal (Abcys), 6 g/l glucose, 2 mM l-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 µg/ml

streptomycine, 100 U/ml pénicilline et 2,5 µg/ml fungizone ; et réservées à 4°C. Les morceaux de cortex restants sont dissociés une seconde fois par un traitement identique de trypsine/DNAse I. La dissociation mécanique est ensuite réalisée à l'aide d'une pipette pasteur polie à la flamme pour réduire de moitié son diamètre. Cette préparation cellulaire dissociée mécaniquement est complétée avec un volume identique de milieu de culture froid. Les 2 préparations sont regroupées et filtrées sur un tamis cellulaire (porosité : 70 µm, BD Falcon). La suspension cellulaire est centrifugée pendant 10 minutes à 190 g. Puis, le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture complet ; les cellules sont comptées en présence d'un colorant d'exclusion, le bleu de trypan pour contrôler leur viabilité. Les cellules sont finalementensemencées sur des lamelles de verre de 22 mm de diamètre préalablement poly-l-lysines (Sigma, poids moléculaire : 300 kDa) à une densité de 0,5 x 10⁵ cellules/ml ou dans des flasques de culture de 150 cm² à une densité de 2,5 x 10⁵ cellules/ml. Les cellules sont mises en culture à 37°C dans un incubateur à 5 % de CO₂. Quinze jours après leur ensemencement, les cultures sont agitées afin d'éliminer les éventuelles cellules microgliales présentes. Cette dernière étape permet d'obtenir des cultures enrichies en astrocytes (> 95 % de cellules immunoréactives pour la GFAP, un marqueur astrocytaire).

3. Reverse Transcriptase et Polymerase Chain Reaction.

L'identification des transcrits exprimés par les astrocytes a été réalisée sur des cultures confluentes primaires de 21 jours d'astrocytes (5.10⁶ cellules) par transcription inverse et réaction polymérase (RT) en chaine (PCR). Brièvement, les cultures cellulaires sont préalablement rincées deux fois avec du PBS froid (4°C) et les ARNm totaux sont extraits en utilisant le kit RNeasy protect cell (Qiagen) et selon les instructions du fabricant.

La membrane de silice qui compose les colonnes du kit RNeasy permet de séparer assez spécifiquement les ARN totaux de l'ADN plasmidique et génomique, mais afin de s'affranchir d'une quelconque contamination d'ADN, les ARN issus des cellules sont en plus traitées à la deoxyribonucléase (RNase free DNaseI, 1u/µl, Invitrogen).

3.1 Vérification de la qualité es ARNm totaux.

La qualité des ARNm totaux est vérifiée par dosage spectrophotométrique à l'aide d'un spectrophotomètre à cuve (Beckman DU 640B). Ce dosage permettra d'effectuer l'étape de transcription inverse à partir de la même quantité d'ARN totaux dans tous les échantillons. La quantité d'ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. La concentration en ARN est donnée par la formule suivante :

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times 1/D \times 40 \mu\text{g/ml}, \text{ où } D = \text{facteur de dilution de l'échantillon.}$$

Parallèlement, le rapport A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1,8 et 2, pour témoigner de la pureté de nos extraits d'ARN vis-à-vis des protéines.

3.2 Transcription inverse.

Cette réaction permet d'obtenir un ADN simple brin complémentaire (ADNc) à l'aide d'amorces Oligo-dT et d'une enzyme, la transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen) qui est une version améliorée de la M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). La SuperScript III présente une activité ADN polymérase ARN dépendante ainsi qu'une activité exoribonucléasique hybride dépendante permettant la dégradation des ARN contenus dans les hybrides ADN-ARN. Cette enzyme présente une stabilité thermique accrue et n'est pas inhibée par les ARN de transfert et les ARN ribosomiaux.

L'ADNc est obtenu à partir d'une quantité d'ARN, entre 500 ng et 1 μg (la quantité d'ARN est différente selon les manipulations, elle dépend de l'extraction d'ARN réalisée auparavant), en utilisant des amorces aléatoires (Random hexamers) se fixant sur la partie poly-Adénylée des ARN messagers (ARNm).

Dans notre cas, le simple brin d'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de 1 μg d'ARN totaux et en utilisant le système SuperScript III First-strand synthesis for RT-PCR (Invitrogen) et en suivant le protocole du fabricant.

Afin de s'assurer de l'absence de contamination d'ADN génomique dans nos échantillons lors de la transcription inverse, nous avons réalisé des contrôles avec des échantillons traités et non traités à la DNase I.

3.3 Réaction de polymérase en chaîne.

Les ADNc codant pour les différentes protéines d'intérêt sont amplifiés par PCR. Les amorces ont été conçues selon des séquences référencées dans Inoue et al (2009) et ont toutes été vérifiées en utilisant Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pour s'assurer de leur spécificité. Les amorces ont été synthétisées par Eurogentec et sont fournies déjà en solution dans de l'eau MilliQ à une concentration de 100 μ M.

Gène	Amorces sens	Amorces antisens	Taille de l'amplicon (bp)	T _m (°C)
D1	CATTCTGAACCTCTGCGTGA	GTTGTCATCCTCGGTGTCCT	229	57
D2	GCAGTCGAGCTTTCAGAGCC	TCTGCGGCTCATCGTCTTAAG	404 et 317	60
D3	GGGGTGACTGTCCTGGTCTA	TGGCCCTTATTGAAAAGTGC	169	56
D4	GATGTCTTGGACGCCTTTCT	TCGGCATTGAAGATGGTGTA	150	56
D5	ACCAAGACACGGTCTTCCAC	CACAGTCAAGCTCCCAGACA	189	60
β -actine	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	228	60

Tableau 3: description des amorces utilisées dans notre étude.

Chaque PCR a été réalisée à partir de 50 ng d'ADNc en utilisant le système FastStart High Fidelity PCR system (Roche) et selon le protocole du fabricant. Le mélange réactionnel dans chaque tube est le suivant : 5 μ l tampon réactionnel 10X, 200 μ M dNTPs, 0.4 μ M amorce sens, 0.4 μ M amorce antisens, 50 ng ADNc matrice, 2.5 U enzyme FastStart High fidelity, eau qsp 50 μ l.

Les échantillons sont introduits dans le thermocycleur (Biorad I cycler) et ont subi les cycles suivants : Dénaturation initiale 12 min 95°C, 35 cycles (dénaturation : 30 sec, 95°C ; amorçage : 30 sec, T_m ; élongation : 45 sec, 72°C), élongation 7 min, 72°C.

3.4 Electrophorèse des amplicons.

Une électrophorèse sur gel d'agarose (2% dans tampon Tris Borate EDTA, pH 8.0) est ensuite réalisée durant 2h sous une tension de 50V. Afin de marquer les ADN, un intercalant, le Gelstar Nucleic Acid Gel Stain est ajouté (1/1000^e). Les acides nucléiques sont visualisés grâce au système ChemiGenius (BioImaging systems) équipé d'une lampe UV et d'une camera.

4. Immunocytochimie.

4.1 Immunomarquage sur astrocytes en culture primaire.

Après 14-21 jours de culture sur lamelles, les cellules sont lavées 3 fois 5 min dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, composé de : NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; KH₂PO₄ 1,8 mM ; Na₂HPO₄ 10,1 mM ; pH 7,4) et fixées avec une solution de 4 % de paraformaldéhyde et 0,1 % de glutaraldéhyde dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS contenant 0,2 % de sodium métabisulfite, la fluorescence des aldéhydes libres est neutralisée par incubation pendant 15 minutes sous agitation dans une solution de PBS contenant 0,2 % de sodium métabisulfite plus 0,5 % de borohydrate de sodium. Après 3 rinçages de 5 minutes dans du PBS contenant 0,2 % de sodium métabisulfite, les cellules sont placées dans une solution de blocage et de perméabilisation [PBS avec 4 % sérum normal de chèvre (NGS), 0,2 % Triton X-100] pendant 45 min à température ambiante. Ensuite, les cellules sont incubées 36 heures à 4°C avec les anticorps primaires appropriés. Les anticorps utilisés et leur dilution dans du PBS contenant 4 % de NGS et 0,1 % de Triton X-100 sont : l'anticorps polyclonal (lapin) dirigé contre la D-sérine conjuguée au glutaraldéhyde (GemacBio, 1/2000), contre le récepteur D1 (Calbiochem, 1/1000), contre le récepteur D2 (Calbiochem, 1/1000), contre le récepteur D3 (Calbiochem, 1/500), contre le récepteur D4 (Calbiochem, 1/200), contre le récepteur D5 (Calbiochem, 1/2000), contre la SR (Santacruz, 1/500), les anticorps monoclonaux (souris) dirigés contre la GFAP (Sigma, 1/2000), contre S100β (Sigma, 1/2000), l'anticorps

polyclonal (mouton) contre la DAAO (Rockland, 1/1000), l'anticorps monoclonal (rat) contre DARPP-32 (R&D Systems, 1/1000). Après 4 lavages de 5 minutes dans du PBS contenant 1% de NGS, les cellules sont incubées pendant 1 heure à température ambiante dans les anticorps secondaires Alexa Fluor appropriés (Alexa Fluor 546 anti-souris et Alexa Fluor 488 anti-lapin, Molecular Probes) dilués à 1/1000 dans du PBS contenant 1,5 % de NGS et 0,1 % de Triton X-100. Finalement, les cellules sont lavées dans du PBS et montées sur une lame dans du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories). L'omission de l'anticorps primaire constitue le témoin. Dans ces expériences contrôles, aucun marquage n'a été détecté.

4.2 Immunomarquage sur tranches de cerveau.

4.2.1 Fixation et préparation du tissu.

Les rats d'environ 2 mois sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (50 mg/kg) et perfusés en intracardiaque soit avec une solution refroidie à 4°C de 4 % de paraformaldéhyde et 0.25 % de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate salin (PBS : 0,1 M ; pH 7,4) pour les immunomarquages de la D-sérine soit avec une solution de 4 % de paraformaldéhyde dans un tampon phosphate salin (0,1 M ; pH 7,4). Une fois le rat décapité et le cerveau prélevé, une post-fixation sur la nuit à 4°C est réalisée dans la même solution de fixateur. Le cerveau est ensuite cryoprotégé dans du PBS contenant 30 % de sucrose. Des sections coronales de cerveau de 30 μm contenant le PFC sont réalisées à l'aide d'un microtome à congélation (Micron HM450).

4.2.2 Immunomarquages

Les immunomarquages sont réalisés sur des coupes flottantes, sous agitation (80 rpm) et à température ambiante sauf pour l'étape d'incubation avec les anticorps primaires selon le protocole décrit par Puyal et ses collaborateurs (Puyal et al., 2006). Les coupes sont lavées plusieurs fois dans du PBS contenant 0.1% de sodium métabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Les coupes sont ensuite incubées pendant 20

minutes dans une solution de PBS contenant 0.4% de borohydrate de sodium et 0.2% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ afin de neutraliser l'autofluorescence résultante de la fixation avec les aldéhydes. Après rinçages avec du PBS plus 0.2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, les coupes sont ensuite mises pendant 45 min dans une solution de blocage de PBS contenant 0.2% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 4% de sérum de chèvre normal (NGS) et 0.1% Triton X-100 (Tx-100). Cette étape est nécessaire afin de limiter la liaison non spécifique des anticorps et donc les faux positifs. Les coupes ont été ensuite incubées durant 36h à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans du PBS supplémenté avec 4% NGS et 0.1% Tx-100. Les anticorps primaires utilisés sont : anticorps polyclonaux (Lapin ; GemacBio France) anti D-sérine dilués à 1/1000-1/2000 ; anticorps polyclonaux (Lapin ; Santa Cruz Biotechnology) anti-sérine racémase dilués à 1/1000. ; Anticorps polyclonaux anti-DAAO (Mouton ; Rockland) dilués à 1/1000 ; anticorps monoclonaux anti GFAP (Souris ; clone GA5, Sigma) dilués à 1/1000 ; anticorps monoclonaux anti-S100 β (Sigma ; 1/1000), anticorps polyclonaux (lapin) contre D1 (Calbiochem ; 1/1000); anticorps polyclonaux (lapin) contre D2 (Calbiochem ; 1/1000) et anticorps monoclonaux (rat) contre DARPP-32 (R&D Systems ; 1/1000). Après 3 lavages successifs, l'immunoréactivité est détectée par incubation durant 1h des coupes avec les anticorps secondaires d'espèces appropriées et couplés à des fluorochromes (IgGs Alexa488 et IgGs Alexa546, Invitrogen) dilués à 1/2000 dans du PBS plus 1.5% NGS et 0.1% Tx-100. . Après lavages dans du PBS, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories).

L'omission de l'anticorps primaire a servi de contrôles. Au cours de ces expériences aucun marquage n'a été détecté.

4.3 Imagerie confocale.

L'immunofluorescence a été détectée et analysée à l'aide d'un microscope confocal droit (Leica TCS SP2, Leica microsystems) équipé d'un objectif 63x, 1.4 NA plan apochromatique à immersion à huile. Les images ont été réalisées avec le logiciel Leica TCS software en utilisant un mode séquentiel afin d'éliminer toute interférence éventuelle entre chaque canal d'acquisition et en évitant toute saturation des pixels. De plus, les fenêtres spectrales de détection des photomultiplicateurs ont été fixées

pour chaque fluorophore de sorte qu'aucun signal provenant de l'autre fluorophore ne soit détecté (498-530 nm pour l'Alexa Fluor 488 et 569-622 nm pour l'Alexa Fluor 546). Les images de chaque plan optique Z ont été acquises à une fréquence de 400 Hz et à la résolution maximale de l'objectif (voxel = 60 nm).

Les immunomarquages des cellules de 3 à 5 expériences indépendantes ont été analysées. Les images représentent des superpositions d'au minimum 15 sections optiques consécutives. L'image superposée est représentative des résultats obtenus pour chaque section optique. L'amélioration du contraste et de la luminosité a été réalisée en parallèle sur toutes les images en utilisant le logiciel image J (version 1.43 ; <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Les acquisitions des immunomarquages sur tranches représentent des empilements (Stacks) en Z d'au minimum 60 sections optiques réalisées avec le logiciel image J avec le mode projection en déviation standard.

5. Séparation des acides aminés par électrophorèse capillaire.

5.1 Principe.

L'électrophorèse capillaire permet la séparation, la détection et la quantification de composés organiques (chiraux ou non) ou inorganiques. La séparation résulte de la migration différentielle des molécules dans un champ électrique intense (jusqu'à 30 kV) à travers un capillaire en silice (diamètre interne : 20 à 150 μm , longueur : 20 à 100 cm) rempli d'un électrolyte approprié (Figure 19). La détection est effectuée par un détecteur UV à barrette de diodes ou par un détecteur de fluorescence induite par laser. Le champ électrique appliqué permet la création d'un flux électro-osmotique qui élimine les effets de bord (un des facteurs limitant en chromatographie liquide, dû au flux hydrodynamique). Le champ intense permet également une séparation rapide à très haute résolution. Le faible diamètre interne du capillaire permet l'analyse de faibles volumes d'échantillon (injection : 1-50 nL). Cette technique est particulièrement appropriée pour les composés solubles en phase aqueuse et possédant une fonction ionisable.

5.2 Préparation des échantillons pour l'analyse des acides aminés.

L'analyse du contenu tissulaire ou cellulaire en acides aminés requiert dans un premier temps l'extraction des acides aminés libres. Cette étape est réalisée selon un protocole adapté de Hashimoto et ses collaborateurs (1992b). Les différents échantillons (homogénat cellulaire ou tissulaire) sont traités avec 5 % d'acide trichloroacétique (TCA) à 4°C pour précipiter les protéines et extraire les acides aminés libres. Les échantillons sont placés dans un bain à ultrasons pendant quelques secondes, incubés sur la glace pendant 30 min et centrifugés pendant 10 min à 16 000 g. Le TCA contenu dans le surnageant est ensuite lavé 5 fois avec de l'éther saturé en eau (1 volume de surnageant / 2 volumes d'éther). L'éther résiduel est finalement évaporé toute la nuit avant que les échantillons ne soient placés à -80°C jusqu'à leur analyse.

L'analyse des acides des milieux conditionnés ne requiert pas de précipitation au TCA.

5.3 Séparation des acides aminés - Analyse.

L'analyse des échantillons par électrophorèse capillaire est réalisée en utilisant la technique développée par Zhao et ses collaborateurs (2005) et selon un protocole mis au point par Jean-Pierre Mothet et Magalie Martineau en collaboration avec Jonathan Sweedler et Ting Shi (Université de l'Illinois, Champaigne-Urbana).

La détection des acides aminés est effectuée à la suite de la dérivation chimique des amines primaires avant le capillaire par réaction avec le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA, Invitrogen) en présence de cyanure de potassium (KCN, Sigma). Tous les réactifs sont d'une pureté maximale. La réaction s'effectue avec 2 μ l d'échantillon auxquels sont ajoutés 2 μ l de NDA (100 μ M dans du méthanol) et 2 μ l de KCN (10 mM dans 75 mM d'acide borique). Elle est réalisée dans le noir pendant 20 min. Cette dérivation conduit à la formation de dérivés isoindoles fluorescents (Figure 20). L'analyse est ensuite réalisée sur une électrophorèse capillaire commerciale (Beckmann PACE/MDQ) couplée à un détecteur de fluorescence induite par laser (Picometrics Zetalif Evolution utilisé à une

longueur d'onde de 410 nm). L'injection hydrodynamique (d'une pression de 0,4 psi) est appliquée pendant 8 sec ce qui correspond à environ 7 nl d'échantillon injecté. La post-injection est réalisée par injection hydrodynamique d'électrolyte dilué au 1/10 (0,1 psi, 20 secondes). Le voltage appliqué est de 20 kV dans un capillaire de silice de 50 μm de diamètre interne et de 80 cm de longueur (dont 60 cm de longueur effective) thermostaté à 23°C. L'électrolyte est une solution d'acide borique (120 mM, pH 9,1) contenant 60 mM de sodium déoxycholate (SDC) et 30 mM de β -cyclodextrine. La β -cyclodextrine, un sélecteur chirale et le SDC qui forme des micelles chirales, permettent une séparation chirale dans la phase mobile (Figure 20). Avec une détection de fluorescence induite par laser, la limite de résolution de ce système est de $8 \cdot 10^{-10}$ M de D-sérine.

6. Mesure de la libération d'acides aminés par les astrocytes.

Les cultures primaires d'astrocytes réalisées sur des plaques 6 puits (250000 cellules par puits ; 14-21j) étaient rincées 3 fois pendant 5 min avec du PBS. Suite à cela, les agonistes des récepteurs de la dopamine (Dopamine 1 μM , SKF81297 10 μM , Quinpirole 10 μM) et/ou l'agoniste des récepteurs métabotropiques (groupe I et II) tACPD (50 μM) dilués dans du PBS étaient appliqués (600 μl) sur chaque puits en remplacement du PBS. Les cellules étaient incubées pendant 2, 5 et 10 min. Pour chaque temps et conditions deux puits distincts ont été utilisés. Au bout du temps imparti, le milieu conditionné de chaque puit était entièrement prélevé puis immédiatement congelé pour être ensuite analysé par électrophorèse capillaire.

7. Substances pharmacologiques et enzymes.

Toutes les substances ont été appliquées directement dans la chambre de perfusion des tranches lors des expériences d'électrophysiologie ou dans les chambres contenant les astrocytes en culture. Des solutions stocks appropriées (100x-1000x) étaient réalisées, conservées à -20°C et diluées avec l'aCSF le jour de l'expérience. Le QX-314 (Alomone Labs) était dilué directement dans le milieu

intracellulaire de la pipette d'enregistrement. Le fluoroacétate de sodium a été obtenu chez Fluka.

Les antagonistes et agonistes du système glutamatergique utilisés étaient les suivantes : la picrotoxine, le 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX), le D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (d-APV), le (±)-1-Aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (t-ACPD), le (RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), l'ifenprodil, la sarcosine, la glycine, la D-sérine. Ces composés ont été obtenus chez Tocris Bioscience (london). Le S18841 et le S33084 ont été gracieusement fournis par les laboratoires SERVIER.

Les antagonistes et agonistes dopaminergiques utilisés dans cette étude étaient les suivants : dopamine, quinpirol, SKF81297, PD128907. Ces composés ont été obtenus chez Tocris Bioscience (london). Dans le cas de la dopamine, la solution stock contenait de l'ascorbate de sodium à 1% pour limiter l'oxydation de la dopamine lors de la conservation.

La D-amino acide oxydase (DAAO) de *Rhodotorula gracilis* (*RgDAAO*, EC 1.4.3.3) et la Glycine oxydase (GO) de *B. subtilis* (*BsGO*, EC1.4.3.19) recombinantes ont été gracieusement fournies par le Pr. Loredano Pollegioni (Université de Varese, Italie). La *RgDAAO* recombinante a été exprimée dans *E. coli* et purifiée selon la méthode décrite par Molla et ses collègues (Molla et al., 1998). La préparation enzymatique purifiée avait une activité spécifique de 100 ± 15 U/mg de protéine avec la D-sérine comme substrat. L'efficacité catalytique apparente de la *RgDAAO* pour la D-sérine (k_{cat}/K_m) est de $3.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La *BsGO* a été exprimée dans *E. coli* et purifiée selon la méthode décrite par Job et ses collaborateurs (Job et al., 2002). La préparation enzymatique purifiée avait une activité spécifique pour la glycine comme substrat de 0.9 ± 0.2 U/mg de protéine. L'efficacité catalytique apparente de la *BsGO* pour la glycine (k_{cat}/K_m) est de $0.058 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

8. Analyse des données et statistiques.

Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm l'écart-type à la moyenne (SEM). Dans les expériences d'électrophysiologie, n représente le nombre de

cellules enregistrées. Dans les autres expériences n représente le nombre d'expériences. La significativité statistique est évaluée par les tests paramétriques appariés et non appariés de Student. Une différence est considérée significative à $p < 0.05$ (noté*). $P < 0.01$ est noté** et $P < 0.001$ est noté***.

Résultats et discussion

Résultats et discussion.

Partie 1, publication 1 :

Glial D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex.

Context et but de l'étude :

Le récepteur NMDA est impliqué dans de nombreux processus physiologiques d'une part comme la transmission synaptique ou la plasticité synaptique à long terme et physiopathologique comme l'excitotoxicité d'autre part. Il nécessite pour son activation la liaison d'un agoniste le glutamate et celle d'un coagoniste. Historiquement, la glycine a été décrite comme l'acide aminé jouant le rôle de coagoniste. Il apparaît cependant qu'un autre acide aminé, la D-sérine est le coagoniste endogène dans de nombreuses structures comme la rétine, l'hippocampe ou l'hypothalamus. Le cortex préfrontal est la partie antérieure du lobe frontal du cerveau. Cette région est le siège de différentes fonctions cognitives comme le langage ou la mémoire de travail et plus généralement des fonctions exécutives. Il est clairement démontré que le cortex préfrontal présente des altérations au niveau de la circuiterie chez les patients atteints de schizophrénie. La schizophrénie se caractérise par une triade de symptômes : positifs, négatifs et cognitifs. Les neuroleptiques sont efficaces principalement sur les symptômes positifs. Toutefois, l'adjonction de D-sérine en complément des neuroleptiques améliorent les symptômes négatifs et cognitifs.

Dans cette première étude, nous nous sommes intéressés au rôle respectif de la glycine et de la D-sérine dans le cortex préfrontal du rongeur adulte. Pour cela, nous avons mis au point, une préparation de tranches aigue de cortex préfrontal de rat adulte (2-3 mois). Plus précisément, nous avons déterminé par une approche pharmacologique la nature du coagoniste endogène des récepteurs NMDA localisés sur les cellules pyramidales dans les couches V/VI du cortex préfrontal. Dans un deuxième temps, nous avons élucidé le rôle de ce coagoniste dans la plasticité synaptique à long terme. Finalement, nous avons déterminé l'origine cellulaire, gliale ou neuronale de ce coagoniste.

Méthodes :

Enregistrements électrophysiologiques sur tranches de cortex préfrontal par les techniques de patch-clamp en configuration «cellule entière»,

Immunomarquages sur tranches de PFC et acquisition en microscopie confocale pour l'étude de la localisation cellulaire de la D-sérine, sérine racémase et DAAO.

Détermination des niveaux endogènes dans le cortex préfrontal de D-sérine, glycine, glutamate par électrophorèse capillaire.

Résultats.

Au cours de cette étude, nous avons tout d'abord confirmé par électrophorèse capillaire, la présence de D-sérine, glycine et de glutamate dans le cortex préfrontal.

Des études électrophysiologiques sur des tranches aiguës de cortex préfrontal de rat adulte ont révélé tout d'abord, que les récepteurs NMDA des neurones pyramidaux présent à la synapse sont constitués des sous-unités NR2A et NR2B. L'application de D-sérine et de sarcosine, un antagoniste des transporteurs membranaires de la glycine, augmente l'amplitude des courants NMDA et sont sans effets sur les courants AMPA. Ces résultats indiquent qu'en condition basale, le récepteur NMDA n'est pas saturé.

Afin de déterminer le rôle spécifique de la glycine et de la D-sérine, nous avons dégradé spécifiquement ces deux acides aminés grâce à deux enzymes, la glycine oxydase (GO) et la *RgDAAO*. L'application de *RgDAAO*, dégrade spécifiquement la D-sérine et diminue l'amplitude des courants NMDA alors que la GO est sans effet. Il est intéressant de noter que ces deux enzymes ne modifient pas les courants AMPA. Ces résultats démontrent le rôle de la D-sérine comme coagoniste endogène du récepteur NMDA à la synapse.

Suite à cela nous avons déterminé le rôle du récepteur NMDA et de la D-sérine dans la LTP. Suite à une stimulation à haute fréquence (HFS, 3x100Hz) des couches I/II du PFC, on induit une LTP qui est bloqué en présence d'AP5. Le récepteur NMDA est donc indispensable à l'induction de la LTP. Par ailleurs, afin de confirmer le rôle de la D-sérine, nous avons réalisé une HFS sous *RgDAAO*. Dans ces

conditions, l'induction de la LTP est impossible, confirmant le rôle majeur de la D-sérine.

Les techniques d'immunohistochimie nous ont permis de mettre en évidence la présence de D-sérine et de sérine racémase, principalement au niveau astrocytaire. Les astrocytes sont donc la principale source de D-sérine. L'enzyme de dégradation de la D-sérine, la *RgdAAO* est localisée aussi bien dans les neurones que dans les astrocytes.

Finalement, l'application de FAC, un inhibiteur métabolique des astrocytes, bloque la LTP et diminue l'amplitude des courants NMDA. Ces effets délétères sont réversés en présence de D-sérine.

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons donc pu démontrer que la D-sérine est le coagoniste endogène des récepteurs NMDA synaptique. Dans un deuxième temps, nous avons montré le rôle indispensable de cet acide aminé et des récepteurs NMDA dans l'induction d'une LTP. Finalement, la D-sérine est synthétisée et libérée par les astrocytes. L'ensemble de ces résultats sont primordiaux pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-tendant la schizophrénie.

Glial derived D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex

Pascal Fossat^{1,2*}, Fabrice R. Turpin^{1,2*}, Silvia Sacchi³, Jérôme Dulong^{1,2}, Jean-Michel Rivet⁴, Loredano Pollegioni³, Mark J. Millan⁴, Stéphane H. R. Oliet^{1,2} and Jean-Pierre Mothet^{1,2}

¹INSERM U862, Neurocentre Magendie 33077 Bordeaux, France - ²Université de Bordeaux, 33077 Bordeaux, France - ³Dipartimento di Biotecnologie e Scienze Molecolari, Università degli Studi dell'Insubria, and The Protein Factory, Centro Interuniversitario di Biotecnologie Proteiche, Politecnico di Milano and Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italy - ⁴Institut de Recherche Servier, 78290 Croissy-sur-Seine, France

*Contributed equally to the work

Corresponding author: Jean-Pierre Mothet
INSERM U862 - Neurocentre Magendie
146, rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux Cedex, France
Phone: (33) 5 5757 37 42 - Fax: (33) 5 5757 3750
Email: jean-pierre.mothet@inserm.fr

Running title : Functions of D-serine at NMDARs in the PFC

Number of figures: 6

Number of pages: 34

Number of words for Abstract (n=217) Introduction (n=606), Discussion (n=2147) reference (n=70)

Abstract

NMDA receptors (NMDARs) are implicated in numerous neurophysiological and neuropathological processes in the cerebral cortex. Their activation requires not only the binding of glutamate but also of a co-agonist. Whereas glycine and D-serine (D-ser) have been suggested to play such a role at central synapses, the nature of the co-agonist in cerebral cortex remains unknown. We first show that the glycine-binding site of NMDARs is not saturated in acute brain slices preparations of prefrontal cortex (PFC). Using enzymes that selectively degrade either D-ser or glycine, we demonstrate that under the present conditions D-ser is the principle endogenous co-agonist of synaptic NMDARs at mature excitatory synapses in layers V/VI of PFC where it is essential for induction of long term potentiation (LTP). Furthermore, blocking the activity of glial cells with the metabolic inhibitor, fluoroacetate, impairs synaptic transmission and prevents the induction of LTP. Synaptic transmission and LTP can be restored by exogenous D-ser, indicating that this D-amino acid mainly originates from glial cells in the PFC, as further confirmed by double-immunostaining studies for D-serine, serine racemase and DAAO versus GFAP. Our findings suggest that D-ser modulates neuronal networks in the cerebral cortex by gating the activity of NMDARs, and that alterations in its levels are of relevance to the induction and potentially treatment of psychiatric and neurological disorders.

Keywords: Astrocytes, co-agonist, NMDA receptors, prefrontal cortex, excitatory synapses

The N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) subfamily of glutamate receptors is widely expressed in the central nervous system (CNS) where it are indispensable to many of the activity-dependent changes in synaptic strength and connectivity underlying higher brain functions such as memory formation and cognition (Malenka and Bear, 2004; Rebola et al., 2010). Dysfunction of NMDA receptors is considered central to the pathophysiology of neurologic and psychiatric disorders. Indeed, NMDAR hyperactivity can cause cell death in stroke and chronic neurodegenerative disorders such as Parkinson, Alzheimer's diseases and HIV-associated dementia (Kemp and McKernan, 2002; Hardingham and Bading, 2003). By contrast, hypoactivity of NMDAR induces apoptosis during brain development and may contribute to psychotic and cognitive symptoms associated to schizophrenia (Millan, 2005; Ross et al., 2006).

In addition to the agonist glutamate, activation of the NMDAR requires the binding of a coagonist which was originally thought to be glycine (Johnson and Ascher, 1987; Paoletti and Neyton, 2007). However, studies over the last decade have shown that the CNS makes significant amount of an atypical amino acid, D-serine (D-ser) (Hashimoto and Oka, 1997; Martineau et al., 2006; Wolosker, 2007). D-Ser is converted from L-ser by serine racemase (SR), an enzyme enriched in the CNS and is thought to be degraded by D-amino acid oxidase (DAAO) (Martineau et al., 2006; Wolosker, 2007; Pollegioni and Sacchi, 2010). Functional studies have demonstrated that the D-amino acid appears to be the physiological ligand for the coagonist site of NMDARs in different brain areas like the hippocampus (Mothet et al., 2000; Yang et al., 2003; Mothet et al. 2006; Zhang et al., 2008; Basu et al., 2009), the retina (Stevens et al., 2003; Kalbaugh et al., 2009) and the hypothalamus (Pاناتier et al., 2006).

Compelling evidence suggests that besides its physiological functions, D-ser may participate in excitotoxic events when released in excess (Martineau et al., 2006). Indeed, SR-deletion confers neuronal protection to cerebral ischemia and excitotoxicity (Mustafa et al., 2010), and to β -amyloid 1-42 peptide injury in the forebrain (Inoue et al., 2008). By contrast, aging and schizophrenia are associated with decreased D-ser levels (Hashimoto et al., 2005; Bendikov et al., 2007; Mothet et al. 2006; Sacchi et al., 2008; Turpin et al., 2009).

As such, D-ser modulation appears to be central to many brain functions but also to play a role in the etiology of neurodegenerative disorders and psychiatric diseases affecting particularly the cerebral cortex. Nevertheless, whether D-ser serves as the endogenous co-agonist of synaptic NMDARs in the cerebral cortex is unknown. Amongst the different cerebral areas, the prefrontal cerebral cortex (PFC) is critical for social cognition, conceptualization and working memory whose disturbances are evident in Alzheimer disease, stroke or schizophrenia (Goto et al., 2010). In this study, we examined the respective roles of glycine versus D-ser in governing the activity of NMDARs localized in layers V/VI of PFC where their amount is the largest (Wang et al., 2008). We have developed an acute brain slice preparation of prelimbic area, an analog structure of primate PFC, from adult rat. We here demonstrate that PFC of adult rats contains high levels of D-ser and that the co-agonist site of NMDARs in layers V/VI is not saturated. Using enzymes that selectively degrade either D-ser or glycine, we further report that under the present conditions D-ser is the major endogenous co-agonist of synaptic NMDAR. Furthermore, we show that D-ser is produced mainly by astrocytes in layers V/VI of PFC and that D-ser and glia are both necessary for the induction of long term synaptic plasticity. Our findings thus underpin therapeutic strategies targeting D-ser availability in the treatment of brain disorders such as schizophrenia or stroke where the operation of NMDARs is disrupted.

Materials and Methods

All experiments were conducted with respect to European and French directives on animal experimentation.

Slice preparation and electrophysiological recordings

Experiments were carried out on acute slices obtained from 45-60 old days Wistar rats. The rats were anaesthetized with isoflurane and decapitated. The brain was then quickly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. Coronal slices (300 μm) including the PFC were obtained and allowed to recover for at least 45 min at 31 °C in a submerged chamber containing ACSF before recording. After 30-60 minutes recovery at room

temperature, one slice was transferred and submerged in a recording chamber where it was continuously perfused (1-2 ml/min) with ACSF composed of (in mM): NaCl, 123; KCl, 2.5; Na₂HPO₄, 1; NaHCO₃, 26.2; MgCl₂, 1.3; CaCl₂, 2.5; and glucose, 10 (pH 7.4; 295-300 mOsm.kg⁻¹).

Pyramidal PFC neurons in Layers V/VI were identified visually using infrared differential interference contrast microscopy (Olympus BX51). Synaptically evoked excitatory currents (EPSCs) were recorded under whole cell voltage clamp mode. The patch clamp recording pipettes (borosilicate glass, Harvard Apparatus, 2.5-5 MΩ) were filled with caesium chloride (CsCl) solution containing (in mM): CsCl, 130; NaCl, 10; HEPES, 10; QX-314, 5; EGTA, 1; and CaCl₂, 0.1 (adjusted to pH 7.1-7.3 with CsOH; 292-296 mOsm.kg⁻¹). Neurons were clamped first at -70 mV for 5 min after breaking the seal and then depolarized at +40 mV. Membrane currents were recorded at 30°C using an Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments, Inc); signals were filtered at 2 kHz and digitized at 5 kHz *via* a DigiData 1440A interface (Molecular Devices). Series resistance (6-15 MΩ) and holding current (I_h) were monitored throughout the experiment. Cells with R_a > 25 MΩ or I_h > -200 pA at resting potential were excluded from data analysis, as well as any cell for which a > 20 % change in those parameters occurred during the course of the experiment. The paired pulse ratio (PPR) was calculated as the peak amplitude of the second evoked EPSC (2)/peak amplitude of the first EPSC (1). The pulse duration was 100 μs and the interval between the two pulses was 100 ms. Glass electrodes filled with ACSF were used to stimulate the layers I/II of the prelimbic area. For AMPA and NMDA EPSCs, the pulse duration was 100 μs and the interval between two pulses was respectively 15 s for AMPA EPSCs and 30 s for NMDA EPSCs. In all figures, current curves are mean of at least 10 successive responses.

For the induction of LTP, a 4x1 s pulses protocol was used at I=0, with a 100Hz stimulation period for each pulse. The interval between each pulse was 15 s. In some experiment, current clamp mode was used to study the pattern of discharge of the pyramidal neurons from which EPSCs were recorded. In those cases, the recording electrodes were filled with (in mM): K-gluconate, 120; KCl, 20; HEPES, 10, EGTA, 1; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.1 (adjusted to pH= 7.2-7.4; 290 ± 5 mOsm.Kg⁻¹).

Data analysis and statistics

Data were collected and analyzed using pClamp10 software (Axon Instruments, Inc). They are expressed as percentage values and are reported as mean \pm the standard error of the mean (SEM) of n cells. Statistical significance was evaluated paired or unpaired Student's t -test. Significance was assessed at $p < 0.05$.

Immunohistochemistry

Wistar rats 45-60 old days were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50mg/kg, intraperitoneally), transcardially perfused with an ice-cold solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4 for immunostainings including SR and DAAO antibodies, and supplemented with 0.25% glutaraldehyde for D-ser immunostainings, brain were explanted and subjected to an overnight postfixation in the same solution and finally cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PBS (pH 7.4). Brain coronal 30 μ m sections were cut on a freezing microtome (Micron HM450). After several washes in PBS, free floating brain sections were immunostained as described previously (Puyal et al., 2006). After a blocking/permeabilization step, sections were probed for 36 h at 4 °C with pairs of primary antibodies diluted in PBS plus 4% normal goat serum and 0.1% Triton X-100. After several washes, the slices were incubated for 1h at room temperature with pairs of Alexa secondary antibodies (Alexa 488 anti-rabbit/Alexa 546 anti-mouse or Alexa 488 anti-sheep/Alexa 546 anti-mouse, Molecular Probes) at 1:2,000 dilution in PBS plus 1.5% normal goat serum and 0.1% Triton X-100. Finally, slices were washed and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Controls were performed by avoiding the primary antibodies. Immunofluorescence was analyzed using a laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP2; Leica Microsystems). The confocal images were acquired using the Leica TCS software with a sequential mode to avoid interference between each channel and without saturation of any pixel. Moreover, emission window were fixed for each fluorophore in conditions where no signal is detected from the other fluorophore. Stack images were taken in the PFC area, and a Z-projection has been made with ImageJ© 1.43 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) in standard deviation projection mode.

Determination of amino acids tissue content

Levels of endogenous amino acids were determined on acute PFC slices from the same rats. Because of the limited amount of tissue per slice, 3-4 slices (approx. 1.5 mg) were pooled together. Analyses of the samples were performed with a commercial laser-induced fluorescence capillary electrophoresis (CE-LIF) (CE: Beckman Coulter, P/ACE MDQ; LIF: Picometrics, LIF-UV-02, 410 nm 20 mW) as following. Briefly, samples were first deproteinized by addition of cold trichloroacetic acid to a 5% final concentration. The suspension was centrifuged at 10,000 x g for 5 min, and the TCA was extracted from the supernatant with water-saturated diethyl ether. Liquid phase of amino acids were processed for micellar CE-LIF (Zhao et al., 2005). Briefly, the samples were fluorescently derivatized at 60 °C for 15 min with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) before being analyzed by CE using a hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) based chiral separation buffer. All data were collected and analyzed using Karat 32 software v8.0 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

The amount of amino acids was referred to the protein content determined by the Lowry method using the DC protein Bio-Rad (Hercules, CA) assay with bovine serum albumin (BSA) as standards. The quantity of amino acids in the PFC samples was determined from a standardized curve and peak identification was made by spiking the fraction with the appropriate amino acid.

Drugs, enzymes and antibodies

All drugs were bath-applied. Appropriate stock solutions were made, stored at -20°C and diluted to the final concentration with ACSF containing vehicle (<1/1000) just before application. Picrotoxin, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7 sulfonyl-benzo[f] quinoxaline (NBQX), D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5), ifenprodil, sarcosine, D-ser and glycine were obtained from TOCRIS bioscience. Sodium fluoroacetate (FAC) was obtained from Fluka. S18841 was a gift from Laboratoires Servier. Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). D-Cycloserine and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) were from Sigma-Aldrich.

Recombinant *R. gracilis* D-amino acid oxidase (*RgDAAO*, EC 1.4.3.3) was overexpressed in *E. coli* cells and purified as reported earlier (Molla et al., 1998); the final enzyme preparation had a specific activity of 100 ± 15 U/mg protein on D-ser as substrate. Recombinant *B. subtilis* glycine oxidase (*BsGO*, EC 1.4.3.19) was overexpressed in *E. coli* cells as well (Job et al., 2002); the final enzyme preparation had a specific activity of 0.9 ± 0.2 U/mg protein on glycine as substrate. These flavoenzymes specifically degrade D-ser (*RgDAAO*) and glycine (*BsGO*), as demonstrated by the corresponding apparent catalytic efficiency (k_{cat}/K_m ratio) values: k_{cat}/K_m ratios of 3.0 and $0.058 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ were determined for *RgDAAO* on D-ser and glycine, respectively (Molla et al., 1998; Pollegioni et al., 2007), while the k_{cat}/K_m ratios determined for *BsGO* were 0.00025 and $0.867 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ on D-ser and glycine, respectively (Job et al., 2002). To degrade D-ser or glycine, slices were incubated for at least 45 min and then continuously perfused with aCSF containing *RgDAAO* (0.2-0.4 U/ml) or *BsGO* (0.1-0.2 U/ml), respectively.

Affinity-purified rabbit polyclonal antibodies against conjugated D-ser and against SR (H-150) were from GemacBio (France) and from Santa Cruz Biotechnology (USA), respectively. Sheep polyclonal anti-DAAO antibody was from Rockland (USA) and affinity-purified mouse monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (clone G-A-5) was from Sigma.

Results

Evoked-NMDA receptor-mediated EPSCs in layers V/VI PFC neurons

We first showed that both D-ser and glycine are present in PFC in significant amounts (D-ser: 0,144 nmol/mg prot; glycine: 0,805 nmol/mg prot) as revealed by capillary electrophoresis (Fig. 1A). The retrieved amounts are comparable to the ones found in others brain areas such as the hypothalamus (Pاناتier et al., 2006), the hippocampus (Mothet et al., 2006) or the retina (Stevens et al., 2003). This results indicate that both amino acids, glycine and D-ser are candidates to act at NMDARs in the PFC.

Currents on layers V/VI pyramidal cortical neurons were recorded in the whole-cell patch clamp configuration. These neurons displayed a mean resting membrane potential of $(-64 \pm 0.4\text{mV})$ and were able to sustain firing when depolarized above

spike threshold. We studied glutamatergic transmission in layers V/VI PFC neurons by stimulating excitatory afferents through a glass electrode placed in layers I/II (Fig. 1B-C). When recorded at -70 mV and under picrotoxin (50 μ M), excitatory postsynaptic currents (EPSCs) were entirely mediated by AMPA/kainate receptors since they were insensitive to AP5 (50 μ M) and blocked by NBQX (10 μ M) (Fig. 1D). To isolate the NMDA component of the EPSCs, we clamped the cells at +40 mV in the presence of NBQX. Under these conditions, the evoked current had much slower rise time and decay-time as expected for NMDARs (Wang et al., 2008) and was inhibited by AP5 (Fig. 1E), confirming that it was mediated by NMDA receptors (NMDARs). These responses were also partially blocked with ifenprodil (3 μ M; $73.5 \pm 7.4\%$ of control, $n=7$, $p=0.012$) (Fig. 1F), a NR2B-subunit containing NMDAR antagonist (Panatier et al., 2006; Paoletti et al., 2007; Wang et al., 2008) indicating that synaptic NMDARs are mainly composed of NR2A (Massey et al., 2004).

We next checked for the level of occupancy of the NMDAR glycine binding site. Exogenous application of D-ser (100 μ M) to the bathing solution induced a significant and reversible increase in the amplitude of the NMDAR-mediated EPSCs ($125.0 \pm 6.2\%$ of control, $n=17$, $p=0.001$, Fig. 2A). D-ser had no effect on AMPAR-mediated EPSCs (Fig. 2B). A potentiating effect ($115.6 \pm 1.9\%$ of control, $n=7$, $p<0.001$) was also observed when glycine transporters (GlyTs) were blocked with 0.5 mM sarcosine (Fig. 2C, D). Finally, we used two different specific partial agonists of the glycine site, D-cycloserine and S18841. Again, application of either one or the other significantly increases the NMDA component ($121.3 \pm 5.1\%$ and $120.7 \pm 3.6\%$ for D-cycloserine and S18841, respectively) (Fig. 2E, right). A dose-response curve shows that D-ser is the more effective at lower doses (EC_{50} for D-ser: 26.5 μ M, D-cycloserine: 202.3 μ M, S18841: 439.3 μ M). Taken together, these results indicate that the glycine site of NMDARs in layers V/VI PFC pyramidal neurons is not fully saturated by the endogenous co-agonist at least in acute brain slices.

D-Serine is the endogenous co-agonist of NMDARs in layers V/VI PFC neurons

To identify whether D-ser, glycine, or both amino acids acted as endogenous co-agonists of synaptic NMDARs in layers V/VI PFC pyramidal neurons, we investigated the action of two enzyme scavengers, yeast D-amino acid oxidase (*RgDAAO*) and

bacterial glycine oxidase (*BsGO*), that selectively degrade D-ser and glycine, respectively (Job et al., 2002; Molla et al., 1998; Panatier et al., 2006). To assess the action of these enzymes on synaptic NMDARs, slices were incubated for at least 45 min with either *RgDAAO* (0.2 U/ml) or *BsGO* (0.2 U/ml) and the AMPA/NMDA ratios of peak currents were compared between these different conditions (Fig. 3A, B). In slices treated with *RgDAAO*, this ratio was largely increased (control vs *RgDAAO*: 1.09 ± 0.18 versus 2.20 ± 0.26 , $n=6$, $p=0.006$) compared to control conditions, whereas AMPAR-mediated EPSCs were not impacted (Fig. 3A, C). To ensure that this change in the AMPA/NMDA ratio of peak currents was due to degradation of D-ser and then to the impairment of NMDAR mediated currents, we subsequently applied exogenous D-ser that restored the AMPA/NMDA peak current ratio (1.40 ± 0.15 , Fig. 3A, D). Collectively, these findings strongly support the idea that in the PFC, D-ser is an endogenous co-agonist of synaptic NMDARs as reported for others brain areas (Yang et al., 2003; Stevens et al., 2003; Panatier et al., 2006; Zhang et al., 2008).

We next investigated the contribution of endogenous glycine to NMDARs activity at the same synapses using *BsGO*. Unlike following *RgDAAO* incubation, we did not detect any significant changes in the AMPA/NMDA peak current ratio (control vs *BsGO*: 1.24 ± 0.25 , $n=11$, $p=0.62$, Fig 3B, C). Furthermore, the application of $100 \mu\text{M}$ D-ser had an effect similar to that observed in the absence of *BsGO* ($120.4 \pm 10.1\%$ of control, $n=10$, $p<0.05$) indicating that degradation of glycine did not affect NMDA-EPSCs (Fig. 3C, D). Interestingly, glycine ($10\text{-}500 \mu\text{M}$) failed to induce any change in NMDA-EPSCs (data not shown), an effect that may be related to the presence of highly efficient transporters for the amino acid that clear quickly up the neuromodulator from the synaptic cleft. Therefore, these data support the idea that glycine, unlike D-ser, is not an endogenous co-agonist at synaptic NMDARs on layers V/VI PFC pyramidal neurons.

Because endogenous D-ser regulates the activity of NMDARs in PFC, we made the assumption that the D-amino acid may contribute to the induction of long-term changes in synaptic plasticity notably the long-term potentiation (LTP) which in the cerebral cortex like in others brain areas requires NMDAR activation (Massey et al., 2004; Banerjee et al., 2009). LTP was induced by applying tetanic trains ($4 \times 1 \text{ s}$

stimuli with 15 s interval) to the excitatory inputs in layers II/III. This protocol reliably induced a long-lasting increase in the amplitude of the evoked-EPSCs ($162.4 \pm 18.3\%$ of control, $n=7$, $p=0.007$, Fig. 4A). Such a LTP was abolished in the presence of D-AP5 in the bath ($96.1 \pm 18.7\%$ of control, $n=5$, $p=0.44$, Fig. 4A), indicating that it depended on NMDAR activation as in many other brain regions. Interestingly, the same induction protocol yielded no potentiation in the presence of *RgdAAO* that degrades D-ser ($81.0 \pm 13.0\%$ of control, $n=5$, $p=0.12$). LTP could be rescued to control values when the blocking effect of *RgdAAO* is antagonized by providing glycine to the brain slices ($163.4 \pm 19.8\%$, $n=5$, $p=0.016$, Fig. 4B). These results support the notion that D-ser is governing the plasticity of excitatory synapses in the CNS as observed in the hippocampus (Yang et al., 2003; Mothet et al., 2006), and the hypothalamus (Panatier et al., 2006).

Glia as a main source for D-ser in the PFC

Recent data reveal that in the cerebral cortex and others brain regions, neurons in addition to astrocytes are an important source of D-ser (Kartvelishvily et al., 2006; Miya et al. 2008; Rosenberg et al., 2010). To test whether PFC D-ser originates from astrocytes or neurons in layers V/VI PFC, we first performed a series of immunostainings for D-ser and for its metabolizing enzymes, serine racemase (SR) and D-amino acid oxidase (DAAO) (Martineau et al., 2006). We show that the amino acid is evenly present in GFAP-positive soma and processes but also in the cell bodies of neurons (Fig. 5A). While DAAO is found in both neurons and glia (Fig. 5A), only astrocytes express abundantly SR suggesting that in the PFC, D-ser is synthesized mainly if not exclusively by astrocytes.

The presence of SR in PFC glia cells strongly suggested that those cells contribute to the regulation of NMDAR functions in the PFC through the release of D-ser. Thus, to test this hypothesis, we next assessed the effect on synaptic transmission and LTP of fluoroacetate (FAC, 5 mM, 40 min), a glia-specific metabolic inhibitor (Hassel et al., 1997; Hülsmann et al., 2003; Andersson et al., 2007; Zhang et al., 2008; Okada-Ogawa et al., 2009). As expected if glia was the source of D-ser. FAC produced a significant increase in the AMPA/NMDA ratio of peak currents (FAC vs control: 3.15 ± 0.70 , $n=6$, $p=0.03$, Fig. 6A), while AMPA-EPSCs are not affected

(data not shown) similar to that observed when D-ser was degraded with *RgdAAO* (Fig. 3A, C and D). At the same time, release probability is not impaired by FAC as paired pulse ratio (PPR) of AMPAR-EPSCs in baseline conditions and after 45 min application of FAC (control: $100.1 \pm 7.9\%$ versus FAC: $110.8 \pm 10.9\%$, $n=5$, $p=0.19$, Fig. 6B) has not changed. Furthermore, we did not observe any effect of FAC on the properties of neurons as indicated by the absence of changes in membrane resting potential (-65.3 ± 1.3 mV at $t=0$ min and -65.36 ± 1.8 mV, at $t=+45$ min, $n=11$), amplitude of action potential (77.2 ± 2.6 mV at $t=0$ min and 73.5 ± 2.4 mV at $t=+45$ min, $n=11$), threshold of action potential (-36.5 ± 1.7 mV at $t=0$ min and -37.7 ± 2.2 mV at $t=+45$ min, $n=11$). The increase in AMPA/NMDA ratio of peak currents could be completely abolished to its control values by adding exogenous D-ser ($100 \mu\text{M}$) to the slice (FAC+D-ser vs. control: 1.60 ± 0.25 , $p=0.14$) (Fig. 6A). These data strongly suggest that glia through the release of D-ser gates NMDARs in layers V/VI PFC pyramidal neurons.

Given the contribution of glia to synaptic transmission, we next examined their role in the induction of LTP which relies on D-ser and is NMDA dependent (Fig. 4). No LTP was observed in FAC-treated slices ($91.4 \pm 14.3\%$ of control, $n=6$, $p=0.54$, Fig. 6C) as observed under AP5 or *RgdAAO*, in agreement with the requirement of glial and D-ser to activate NMDARs. Exogenous application of D-ser reversed the FAC-induced impairment allowing LTP to be induced as in control conditions ($158.4 \pm 31.2\%$ of control, $n=7$, $p=0.03$, Fig. 6B). Therefore, these data indicate that glia through the release of D-ser regulates activity of excitatory synapses in the PFC.

Discussion

The data documented in this study suggest that, under the present experimental conditions at least, in layers V/VI PFC pyramidal neurons, D-ser, but not glycine, is the endogenous ligand of glycine-binding site of synaptic NMDARs. This D-amino acid appears to be mainly derived from astrocytes rather than neurons and is required for long-term synaptic plasticity induction in the mature PFC of rodents.

A role for D-ser in NMDAR-dependent functions at excitatory synapses

Activation of NMDARs requires binding of a co-agonist which was first proposed to be glycine (Johnson and Ascher, 1987). It has however become clear over the last decade that D-ser can play an equivalent role (Wolosker et al., 2007). In hippocampal neurons co-cultured with astrocytes, degradation of D-ser with DAAO affected NMDAR-mediated responses (Mothet et al., 2000). This finding was subsequently extended to acute slice preparations from hippocampus (Yang et al., 2003; Mothet et al., 2006; Zhang et al., 2008) and to other structures such as the retina (Stevens et al., 2003; Kalbaugh et al., 2009) and the hypothalamus (Panatier et al., 2006). Moreover, studies in SR-knockout (KO) mice also suggest that D-ser is an endogenous co-agonist of synaptic NMDARs in the hippocampus (Basu et al., 2009). Correspondingly, NMDAR-mediated synaptic currents are impaired and LTP is blunted in SR-KO mice. We here report that selectively degrading D-ser with *RgDAAO* causes a pronounced but incomplete inhibition of NMDAR-mediated EPSCs, an effect that is neutralized by application of exogenous D-ser. This finding indicates that D-ser is an endogenous co-agonist of NMDARs expressed by layer V/VI PFC pyramidal neurons (Wang et al., 2008). The incomplete blockade of synaptic transmission by *RgDAAO* may reflect incomplete depletion of synaptic D-ser by *RgDAAO*, or a complementary contribution of endogenous glycine to the gating of synaptic NMDARs in the PFC.

In fact, although several studies have examined the possibility that D-ser is the endogenous co-agonist of synaptic NMDARs, few have investigated whether or not glycine plays such a role. Using *BsGO*, an enzyme that specifically degrades glycine, it was established that this amino acid was not an endogenous ligand of the NMDAR glycine-binding site in supraoptic neurons of the rat hypothalamus (Panatier et al., 2006). We report here similar findings at intrinsic excitatory synapses in layers V/VI pyramidal PFC neurons since *BsGO*, unlike *RgDAAO*, did not affect NMDAR-mediated EPSCs. These findings are consistent with previous observations that D-ser is the dominant endogenous ligand of synaptic NMDARs during adulthood in the CNS. They also suggest that glycine might not usually be present at sufficient concentrations within the synaptic cleft to serve as an endogenous co-agonist of synaptic NMDARs, in contradiction to what is often described in the literature. CE-LIF measurements of the PFC content of amino acids revealed a significantly higher

concentration of glycine than D-ser that may question this assertion. However, it is plausible that high affinity glycine transporters GlyT1 and GlyT2 expressed by PFC glia and neurons (Jursky and Nelson, 1996; Chen et al., 2003; Cubelos et al., 2005) suppress glycine levels in the local micro-environment of pyramidal synaptic NMDARs to well below their affinity for the co-agonist (range 0.36–3.7 μ M) (Laurie and Seeburg, 1994). Coexpression of both GlyT1 and NMDARs in *Xenopus* oocytes dramatically reduces the level of glycine capable of reaching the coagonist site (Supplisson and Bergman, 1997). Similarly, inhibition of GlyT transporters potentiates NMDA-mediated responses in the prefrontal cortex (Chen et al., 2003). Accordingly, we observed a modulatory effect of endogenous glycine on NMDA-EPSCs only when GlyTs were initially inhibited with sarcosine. Though the potentiating effect of sarcosine on synaptic NMDA-EPSCs was only modest, this is likely due to the fact that endogenous D-ser competes with glycine for the co-agonist site of synaptic NMDARs (Paoletti and Neyton, 2007). It is conceivable that GlyTs prevent the amino acid from entering the synaptic cleft under physiological conditions. Nevertheless, we cannot discard the possibility that glycine may reach the synapse and then gates the synaptic NMDARs in pathological conditions wherein activity of GlyTs is disrupted. The likelihood of this scenario is supported by studies showing that GlyTs inhibitors displays antipsychotic profiles in rodents (Tsai et al., 2004). Furthermore, genetically-induced reduction of GlyTs expression in mice leads to impairment in glutamatergic neurotransmission in the hippocampus (Tsai et al., 2004; Martina et al., 2005) and retina (Reed et al., 2009). Thus, the relative contribution of glycine versus D-ser at synaptic NMDARs implies that the release of D-ser is operating locally at synaptic sites to underpin synaptic functions (Schell et al., 1997; Mothet et al., 2000; Henneberger et al., 2010).

Our demonstration that D-ser is the endogenous ligand for the glycine-site of synaptic NMDARs prompted an evaluation of its participation in long-term synaptic plasticity since LTP at excitatory synapses relies on NMDAR in particular in the cerebral cortex (Feldman, 2009). Not surprisingly perhaps, we observed a complete blockade of LTP when D-ser was depleted by *RgDAAO*. As LTP and its counterpart long-term depression (LTD) have been proposed as cellular substrate of information processing and memory (Malenka and Bear, 2004; Feldman, 2009; Rebola et al.,

2010), the observation that LTP depends on D-ser further expands the notion that D-ser plays an important function in the cognitive processes. In the present study, we observed that the blockade of NR2B-containing synaptic NMDARs with ifenprodil reduced the total synaptic NMDA current by ~30%. These results indicate that NMDARs at excitatory synapses at PFC layers V/VI pyramidal neurons are preferentially composed of NR2A subunits as previously shown (Zhao et al., 2005) and that NR2B subunits represent only a small fraction (Wang et al. 2008). Noteworthy, both NR2B and NR2A NMDAR subunits contribute to the formation of LTP in the PFC where NR2B-containing NMDARs are engaged in the formation of contextual memory (Zhao et al., 2005).

Astrocytes are involved in the control of NMDARs

Many lines of evidence suggest that D-ser is synthesized and released from glial cells. Immunostaining for D-ser and SR revealed the presence of the D-amino acid and its synthesizing enzyme in astrocytes from different brain regions in adulthood (Schell et al., 1997; Williams et al., 2006; Panatier et al., 2006; Stevens et al., 2003). Using neuron-glia co-cultures and pure neuronal cultures treated with glia medium, it was originally established that glia was the source of D-ser in the hippocampus (Mothet et al., 2000; Ribeiro et al., 2002; Yang et al., 2003; Zhang et al., 2008). Release of D-ser from (Mothet et al., 2005) and trafficking within (Martineau et al., 2008) cortical glial cells in culture indicated that astrocytes could release D-ser through a Ca²⁺-dependent vesicular pathway. The idea that glia represents an important source for D-ser was strengthened by observations made in the hypothalamus where a physiological withdrawal of astrocytic processes was found to be associated with a deficiency in D-ser-mediated NMDARs EPSCs (Panatier et al., 2006). Nevertheless, it has been also established that in brain areas such as the hippocampus, the cerebral cortex or the vestibular nuclei, D-ser may originate from neurons (Puyal et al., 2006; Kartvelishvily et al., 2006; Miya et al., 2008; Rosenberg et al., 2010).

In the present study, we show by immunostaining that D-ser and SR are mainly present in astrocytes (see Fig. 5A). By contrast, PFC neurons likely represent only a minor source of D-ser in a physiological context since SR is lightly expressed by

these cells. The large expression of SR in GFAP positive glial cells in the PFC is consistent with the fact that only glia and notably astrocytes have the ability to synthesize L-serine the substrate of SR (Yamasaki et al., 2001). Although neurons express ASCT1 and ASCT2 allowing for the potential shuttling of L-ser from glia to neurons (Shao et al., 2009; Gliddon et al., 2009), PFC pyramidal neurons are probably unable to synthesize large amount of D-ser. Thus, the low amount of D-ser in PFC neurons could be attributed to the presence of DAAO which degrades the amino acid once taken up by neurons. However, we cannot exclude that PFC neurons may release D-ser when depolarized (Rosenberg et al., 2010) through a non-exocytotic mechanism. Nevertheless, the relative contribution of neuronal *versus* glial-derived D-ser on NMDARs-mediated EPSCs and LTP could be unmasked pharmacologically using FAC, an astroglial aconitase inhibitor (Hassel et al., 1997; Hülsmann et al., 2003; Andersson et al., 2007; Okada-Ogawa et al., 2009). FAC poisoning of glia reduces NMDA-EPSCs and completely blocks LTP induction, in line with the idea that astrocytes are involved in the control of NMDARs activity through the release of D-ser (Yang et al., 2003; Zhang et al., 2008; Stevens et al., 2003). Still, we cannot rule out fully a contribution of neuronal D-ser in regulating synaptic NMDARs as FAC does not totally block NMDA-EPSCs. One possible explanation is that the residual currents are modulated by the neuronal reserve of D-ser released through a sodium dependent antiport as proposed by the group of Wolosker (Ribeiro et al., 2002, Kartvelishvily et al., 2006; Rosenberg et al., 2010). It is also conceivable that FAC indirectly affects the release of D-ser from neurons rather than inhibiting the release of the co-agonist from glia. Indeed, Inhibition of the glial aconitase by FAC leads to accumulation of citrate and to a reduction in the formation of glutamine, an important precursor for neurotransmitter glutamate and GABA (Hamilton and Attwell, 2010).

Under conditions of sustained GABAA receptor blockade, FAC might theoretically inhibit glial glutamine levels thereby affecting the neuronal synthesis of glutamate and in turn the release of D-ser from glia or neurons (Kartvelishvily et al., 2006). However, this latter scenario can be ruled since FAC did not affect the release of neuronal glutamate as suggested by the absence of any changes in PPR (Fig. 6C). If there was a neural source of D-ser in the PFC, functionally eliminating glia with FAC would

not be expected to impact synaptic transmission as neuronal D-ser will compensate the pharmacologically-induced deficit in extracellular D-ser and then result in unaffected synaptic transmission, but the opposite was observed. These observations indicate that the use of FAC selectively targeted the glial contribution to synaptic transmission and unmasked the role of glia-derived D-ser. It has been shown that *in situ* administration of FAC decreases the level of D-ser by 25% in the PFC (Kanematsu et al., 2006) supporting our observations that FAC impacts synaptic transmission most likely by reducing the levels of extracellular D-ser. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that neuronal D-ser may also be important for the function of NMDARs when neuronal DAAO activity is as in schizophrenia (Schumacher et al., 2004; Millan, 2005; Ross et al., 2006; Almond et al., 2006; Verrall et al., 2007; Labrie et al., 2010). The nature of the interplay between neuronal and glia-derived D-ser will require further explorations.

Physiological and pathological relevance

In the prefrontal cortex, NMDARs are dynamically control neuronal circuitry and subserve cognitive functions such as working memory, decision-making, and experience-dependent plasticity (Malenka and Bear, 2004; Feldman, 2009). Therefore, the control of D-ser and its metabolic enzymes may be crucial for physiological processes depending on NMDARs in the mature cerebral cortex (Malenka and Bear, 2004; Feldman, 2009). Moreover, alterations of D-ser levels and function should have important consequences for the activity of neuronal circuitry in the PFC. Accumulating experimental evidence shows that cognitive symptoms of schizophrenia are related to a hypofunction of NMDARs in the PFC (Millan, 2005; Ross et al., 2006). Interestingly, convergent lines of evidence suggest an involvement of perturbed D-ser transmission in schizophrenia (Ross et al., 2006; Bendikov et al., 2007; Verrall et al., 2007; Sacchi et al., 2008; Labrie et al., 2009). Indeed, single polymorphisms for SR and DAAO have been linked to schizophrenia (Schumacher et al., 2004; Detera-Wadleigh and MacMahon, 2006; Pollegioni and Sacchi, 2010). In rodents, genetic loss of DAAO activity reverses schizophrenia-like phenotypes (Almond et al., 2006; Labrie et al., 2010). Co-administration in patients of D-ser with conventional neuroleptics partially ameliorated the negative and cognitive symptoms

of schizophrenia in certain though not all studies (Tsai et al., 1998; Heresco-Levy et al., 2005). Noteworthy, Kantrowitz et al (2010) have reported recently that administration of high doses of D-ser alone (≥ 60 mg/kg/day) in a 4 weeks trial displays effectiveness in treatment of both persistent symptoms and neurocognitive functions in antipsychotics-stabilized patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. Although to be confirmed, the results already opened novel perspectives for treatment of refractory symptoms in schizophrenia by D-serine-based therapy. The demonstration that D-ser controls the activity of NMDARs and long term synaptic plasticity supports therapeutic strategies targeting D-ser in the treatment of schizophrenia and other brain disorders involving either under or overactivity of cortical populations of NMDARs

Acknowledgements: This work was supported by grants from INSERM, Conseil Régional d'Aquitaine, Agence National pour la Recherche (to J.P.M.), the Human Frontier Science Program (to S.H.R.O.) and Institut de Recherche Servier (to J.P.M.). SS and LP were supported by grants from Fondo di Ateneo per la Ricerca (Università dell'Insubria) and from Fondazione Cariplo.

REFERENCES

- Almond SL, Fradley RL, Armstrong EJ, Heavens RB, Rutter AR, Newman RJ, Chiu CS, Konno R, Hutson PH, Brandon NJ (2006) Behavioral and biochemical characterization of a mutant mouse strain lacking D-amino acid oxidase activity and its implications for schizophrenia. *Mol Cell Neurosci* 32: 324-334.
- Andersson M, Blomstrand F, Hanse E (2007) Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. *J Physiol* 585: 843-852.
- Banerjee A, Meredith RM, Rodriguez-Moreno A, Mierau SB, Auberson YP, Paulsen O (2009) Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 19: 2959-2969.

- Basu AC, Tsai GE, Ma CL, Ehmsen JT, Mustafa AK, Han L, Jiang ZI, Benneyworth MA, Froimowitz MP, Lange N, Snyder SH, Bergeron R, Coyle JT (2009) Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Mol Psychiatry* 14: 719-727.
- Bendikov I, Nadri C, Amar S, Panizzutti R, De Miranda J, Wolosker H, Agam G (2007) A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophr Res* 90: 41-51.
- Betz H, Gomez J, Armsen W, Scholze P, Eulenburg V (2006) Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans* 34: 55-58.
- Chen L, Muhlhauser M, Yang CR (2003) Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J Neurophysiol* 89: 691-703.
- Cubelos B, Gimenez C, Zafra F (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex* 15: 448-459.
- Detera-Wadleigh SD, McMahon FJ (2006) G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis. *Biol Psychiatry* 60: 106-114.
- Feldman DE (2009) Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32: 33-55.
- Gliddon CM, Shao Z, LeMaistre JL, Anderson CM (2009) Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *J Neurochem* 108: 372-383.
- Goto Y, Yang CR, Otani S (2010) Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 67:199-207.
- Hamilton NB, Attwell D Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11: 227-238.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26: 81-89.
- Hashimoto A, Oka T (1997) Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol* 52: 325-353.
- Hashimoto K, Engberg G, Shimizu E, Nordin C, Lindstrom LH, Iyo M (2005) Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 767-769.

Hassel B, Bachelard H, Jones P, Fonnum F, Sonnewald U (1997) Trafficking of amino acids between neurons and glia in vivo. Effects of inhibition of glial metabolism by fluoroacetate. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 1230-1238.

Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463: 232-236.

Heresco-Levy U, Javitt DC, Ebstein R, Vass A, Lichtenberg P, Bar G, Catinari S, Ermilov M (2005) D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biol Psychiatry* 57: 577-585.

Hulsmann S, Straub H, Richter DW, Speckmann EJ (2003) Blockade of astrocyte metabolism causes delayed excitation as revealed by voltage-sensitive dyes in mouse brainstem slices. *Exp Brain Res* 150: 117-121.

Inoue R, Hashimoto K, Harai T, Mori H (2008) NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. *J Neurosci* 28: 14486-14491.

Job V, Marccone GL, Pilone MS, Pollegioni L (2002) Glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. Characterization of a new flavoprotein. *J Biol Chem* 277: 6985-6993.

Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529-531.

Jursky F, Nelson N (1996) Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in mouse brain. *J Neurochem* 67: 336-344.

Kalbaugh TL, Zhang J, Diamond JS (2009) Coagonist release modulates NMDA receptor subtype contributions at synaptic inputs to retinal ganglion cells. *J Neurosci* 29: 1469-1479.

Kanematsu S, Ishii S, Umino A, Fujihira T, Kashiwa A, Yamamoto N, Kurumaji A, Nishikawa T (2006) Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular D-serine contents in the rat brain. *J Neural Transm* 113: 1717-1721.

Kantrowitz JT, Malhotra AK, Cornblatt B, Silipo G, Balla A, Suckow RF, D'Souza C, Saksa J, Woods SW, Javitt DC (2010) High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res* 121:125-130.

Kartvelishvily E, Shleper M, Balan L, Dumin E, Wolosker H (2006) Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 281: 14151-14162.

Kemp JA, McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl: 1039-1042.

Labrie V, Fukumura R, Rastogi A, Fick LJ, Wang W, Boutros PC, Kennedy JL, Semeralul MO, Lee FH, Baker GB, Belsham DD, Barger SW, Gondo Y, Wong AH, Roder JC (2009) Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. *Hum Mol Genet* 18: 3227-3243.

Labrie V, Wang W, Barger SW, Baker GB, Roder JC (2010) Genetic loss of D-amino acid oxidase activity reverses schizophrenia-like phenotypes in mice. *Genes Brain Behav* 9: 11-25.

Laurie DJ, Seeburg PH (1994) Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur J Pharmacol* 268: 335-345.

Lee YS, Silva AJ (2009) The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci* 10: 126-140.

Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21.

Martina M, ME BT, Halman S, Tsai G, Tiberi M, Coyle JT, Bergeron R (2005) Reduced glycine transporter type 1 expression leads to major changes in glutamatergic neurotransmission of CA1 hippocampal neurones in mice. *J Physiol* 563: 777-793.

Martineau M, Baux G, Mothet JP (2006) D-Serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci* 29: 481-491.

Martineau M, Galli T, Baux G, Mothet JP (2008) Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine-mediated gliotransmission. *Glia* 56: 1271-1284.

Martineau M, Galli T, Baux G, Mothet JP (2008) Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine-mediated gliotransmission. *Glia* 56: 1271-1284.

Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24: 7821-7828.

Millan MJ (2005) N-Methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 30-53.

- Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 510: 641-654.
- Molla G, Vegezzi C, Pilone MS, Pollegioni L (1998) Overexpression in *Escherichia coli* of a recombinant chimeric *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Protein Expr Purif* 14: 289-294.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (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.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5606-5611.
- Mothet JP, Rouaud E, Sinet PM, Potier B, Jouvenceau A, Dutar P, Videau C, Epelbaum J, Billard JM (2006) A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5: 267-274.
- Mustafa AK, Ahmad AS, Zeynalov E, Gazi SK, Sikka G, Ehmsen JT, Barrow RK, Coyle JT, Snyder SH, Dore S Serine racemase deletion protects against cerebral ischemia and excitotoxicity. *J Neurosci* 30: 1413-1416.
- Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y, Iwata K (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 29: 11161-11171.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125: 775-784.
- Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7: 39-47.
- Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS, Molla G (2007) Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci*. 64:1373-1394.

Pollegioni L, Sacchi S (2010) Metabolism of the neuromodulator D-serine. *Cell Mol Life Sci.* 67: 2387-2404.

Puyal J, Martineau M, Mothet JP, Nicolas MT, Raymond J (2006) Changes in D-serine levels and localization during postnatal development of the rat vestibular nuclei. *J Comp Neurol* 497: 610-621.

Rebola N, Srikumar BN, Mulle C Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* 588: 93-99.

Reed BT, Sullivan SJ, Tsai G, Coyle JT, Esguerra M, Miller RF (2009) The glycine transporter GlyT1 controls N-methyl-D-aspartic acid receptor coagonist occupancy in the mouse retina. *Eur J Neurosci* 30: 2308-2317.

Ribeiro CS, Reis M, Panizzutti R, de Miranda J, Wolosker H (2002) Glial transport of the neuromodulator D-serine. *Brain Res* 929: 202-209.

Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, Wolosker H Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *Faseb J* 24: 2951-2961.

Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT (2006) Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52: 139-153.

Sacchi S, Bernasconi M, Martineau M, Mothet JP, Ruzzene M, Pilone MS, Pollegioni L, Molla G (2008) pLG72 modulates intracellular D-serine levels through its interaction with D-amino acid oxidase: effect on schizophrenia susceptibility. *J Biol Chem.* 283: 22244-22256.

Schell MJ, Brady RO, Jr., Molliver ME, Snyder SH (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 17: 1604-1615.

Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S (2004) Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 9: 203-207.

Shao Z, Kamboj A, Anderson CM (2009) Functional and immunocytochemical characterization of D-serine transporters in cortical neuron and astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 87: 2520-2530.

Stevens ER, Esguerra M, Kim PM, Newman EA, Snyder SH, Zahs KR, Miller RF (2003) D-Serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6789-6794.

Supplisson S, Bergman C (1997) Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 17: 4580-4590.

Tsai G, Ralph-Williams RJ, Martina M, Bergeron R, Berger-Sweeney J, Dunham KS, Jiang Z, Caine SB, Coyle JT (2004) Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8485-8490.

Tsai G, Yang P, Chung LC, Lange N, Coyle JT (1998) D-Serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44: 1081-1089.

Turpin FR, Potier B, Dulong JR, Sinet PM, Alliot J, Oliet SH, Dutar P, Epelbaum J, Mothet JP, Billard JM (2009) Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiol Aging*.

Verrall L, Walker M, Rawlings N, Benzel I, Kew JN, Harrison PJ, Burnet PW (2007) D-Amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *Eur J Neurosci* 26: 1657-1669.

Wang H, Stradtman GG, 3rd, Wang XJ, Gao WJ (2008) A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16791-16796.

Williams SM, Diaz CM, Macnab LT, Sullivan RK, Pow DV (2006) Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons. *Glia* 53: 401-411.

Wolosker H (2007) NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. *Mol Neurobiol* 36: 152-164.

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 Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15194-15199.

Zhang Z, Gong N, Wang W, Xu L, Xu TL (2008) Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cereb Cortex* 18: 2391-2401.

Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhuo M (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47: 859-872.

Zhao S, Song Y, Liu YM (2005) A novel capillary electrophoresis method for the determination of D-serine in neural samples. *Talanta* 67: 212-216.

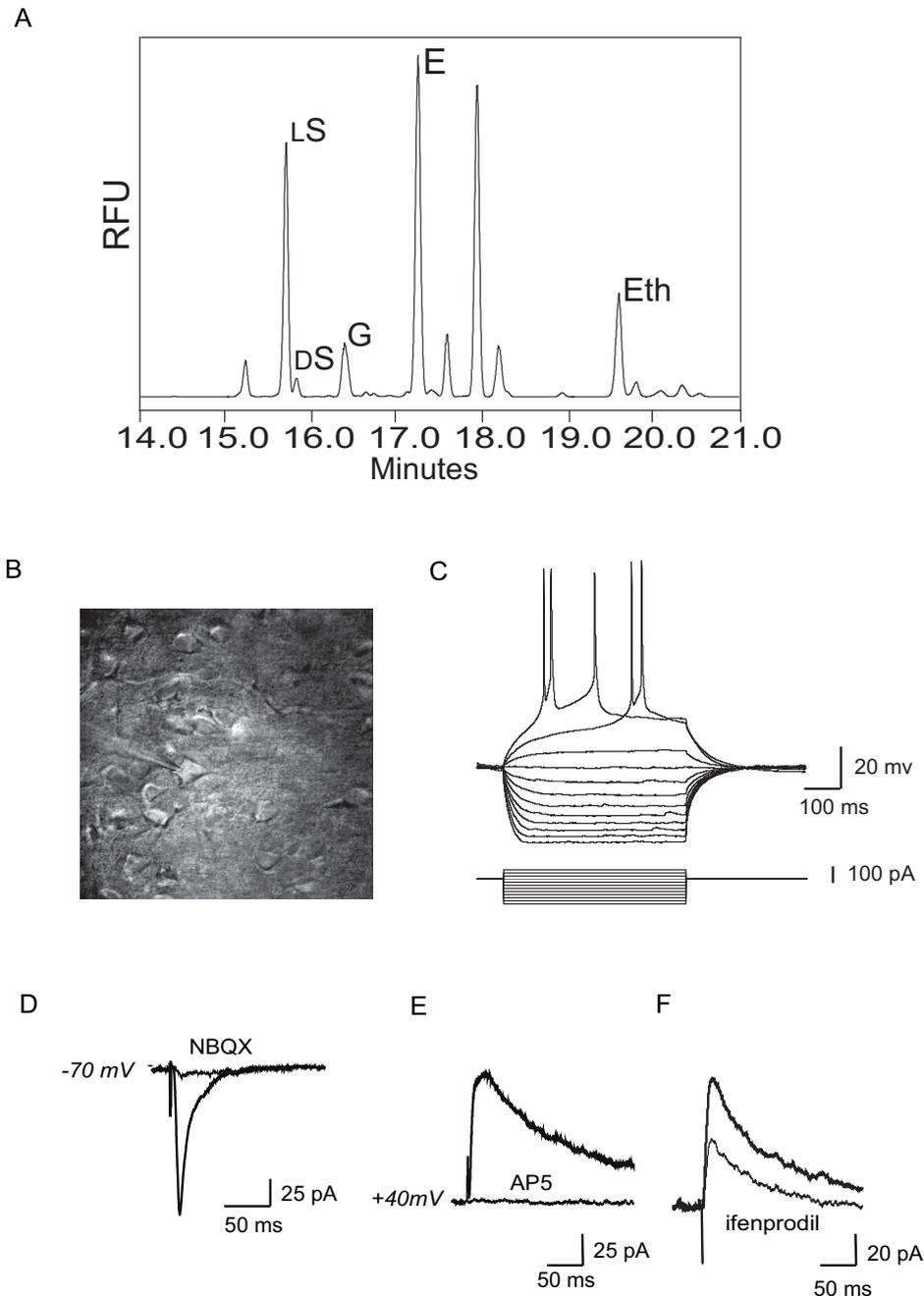


Figure 1: Properties of NMDA currents of layers V/VI pyramidal neurons in the PFC. A) Typical electropherogram of NDA-derivatized amino acids showing the presence of D-ser, glycine and glutamate in the PFC of mature rats. LS: L-serine, DS: D-serine, E: Glutamate, G: glycine, Eth: Ethanolamine (internal standard). B) Micrograph showing patched pyramidal neurons in layer V. C) Characteristic I/V pyramidal cell response in current clamp configuration. D) In voltage-clamp, pyramidal cells (lower trace) present at -70 mV a typical evoked AMPA current in presence of GABA_A inhibitor picrotoxin; this current is blocked by application of 10 μ M NBQX. E) A typical outward NMDA current (upper trace) is revealed at +40 mV under both picrotoxin and NBQX. This current is blocked by application of AP5. An AMPA/NMDA ratio was measured by dividing the NMDA peak current and the AMPA peak current. This ratio is close to 1 in control conditions. F) Layers V/VI pyramidal cell NMDA receptors contain a mixed NR2A/NR2B subunits. Application of 3 μ M ifenprodil reduced NMDA currents by about 30%.

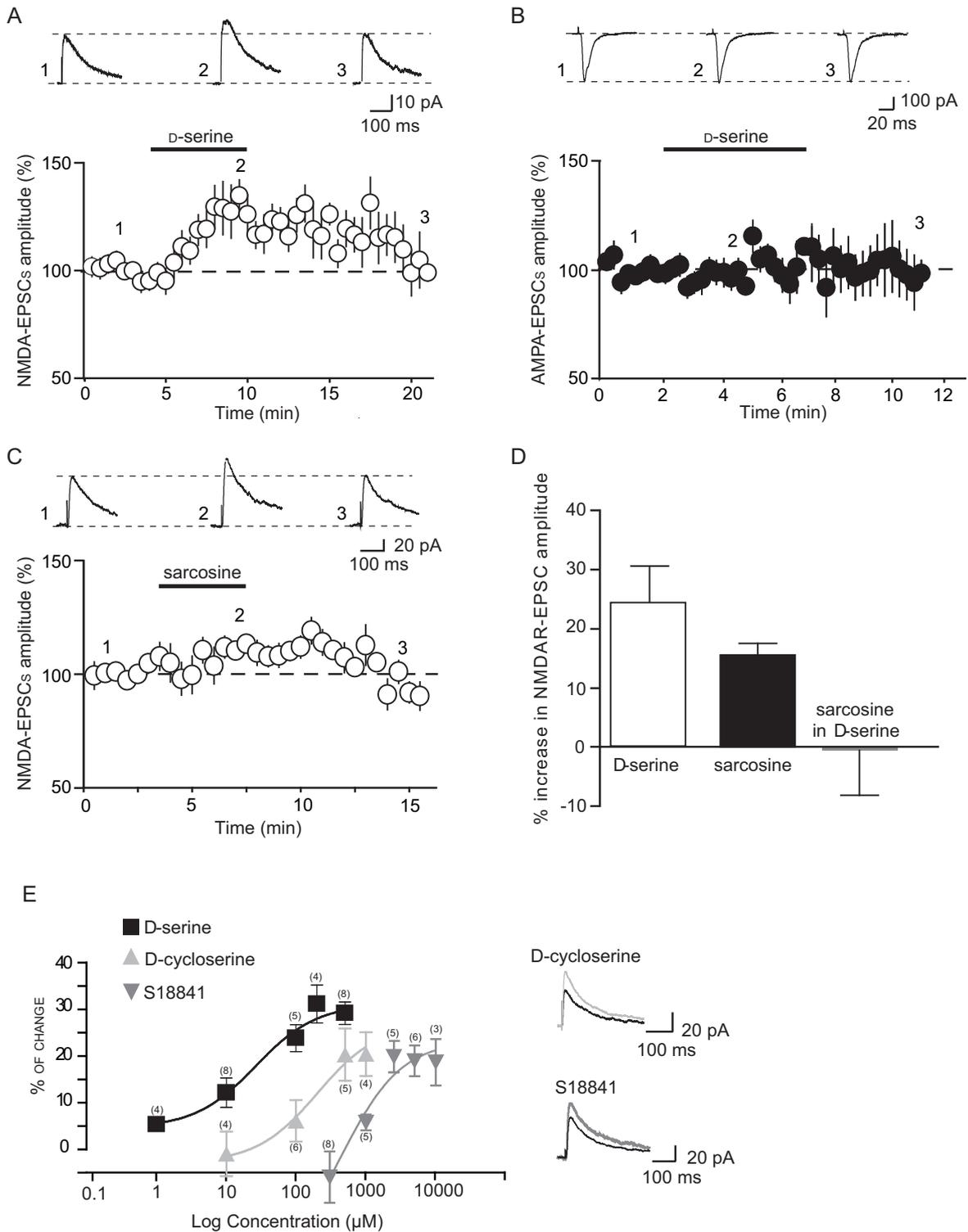


Figure 2: Saturation of NMDA coagonist site. A and B) Glycine site of NMDA receptors is not saturated under control conditions. Indeed, application of 100 μM D-ser reversibly increases NMDA currents of about 20% while no effect is observed on AMPAR-mediated EPSCs (panel B). C) The application of 0.5 mM sarcosine (a specific Gly-T1 inhibitor) increases NMDA currents. D) The potentiating effect of sarcosine (black bar) was abolished when sarcosine was applied in presence of 100 μM D-ser (gray bar). E) Dose-response effect of three different agonists of the glycine site, D-ser, D-cycloserine and S18841. Note that D-ser is much more effective that the two others agonists.

Numbers in panels A-D represents the example of currents for the corresponding condition. Numbers in brackets in panels E represents the number of recorded cells for each dose and each compound.

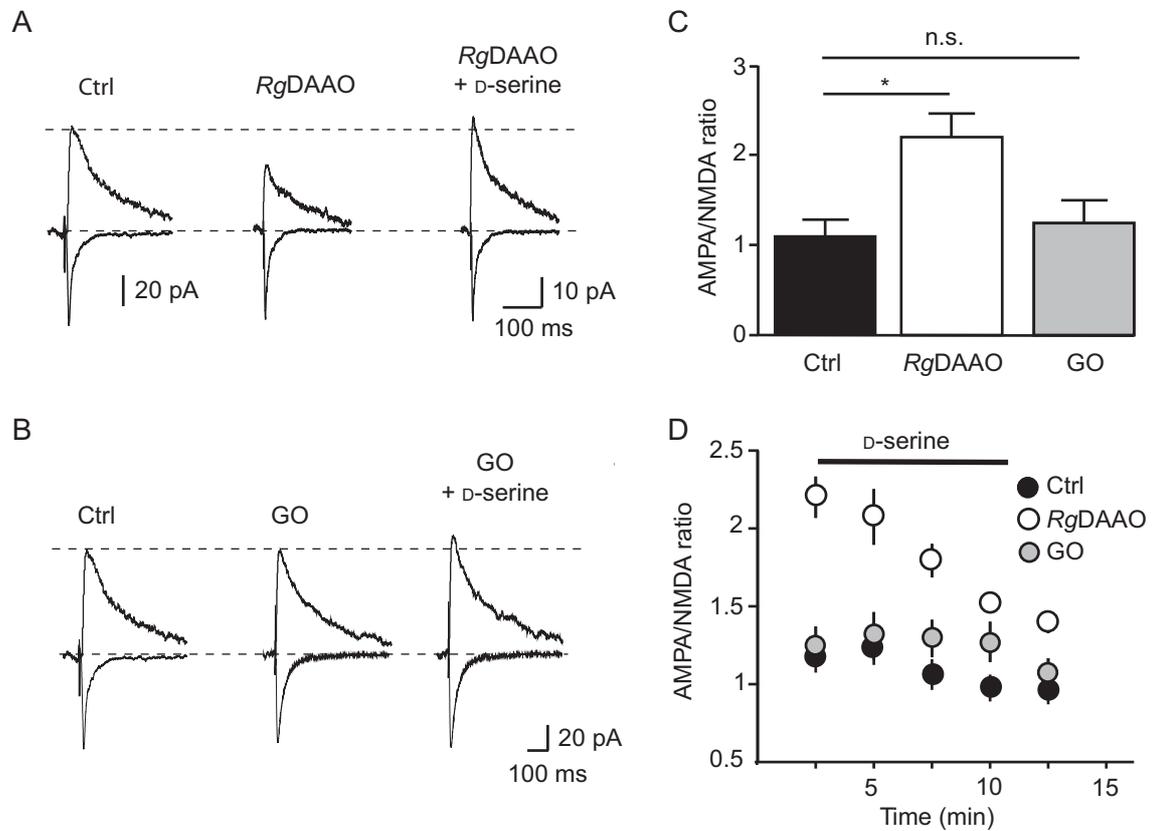


Figure 3: D-serine but not glycine is an endogenous co-agonist of NMDA receptors in layers V/VI pyramidal cells of prefrontal cortex. A-D) AMPA/NMDA ratio after 45 min incubation of slices in *RgDAAO* or *GO*. A) After *RgDAAO*, NMDA current, but not AMPA current, was strongly decreased (panel B, compare control to *RgDAAO*). As a consequence the AMPA/NMDA ratio was significantly increased (panel D, *RgDAAO* and Panel E, first open circle). Subsequent application of 100 μ M D-serine increased NMDA current (Panel B, right). *RgDAAO* was not completely washed out since AMPA/NMDA ratio was brought back only to control value (Panel E, compare black circle to open circles). By contrast, AMPA/NMDA ratio of slices firstly incubated in *GO*, was not modified (Panel C, compare control to *GO*, panel D, Grey histogram and Panel E, first grey circle.). Subsequent application of D-serine slightly increased NMDA current (~20% see text.) as in control conditions (panel C, left, panel E, grey circle).

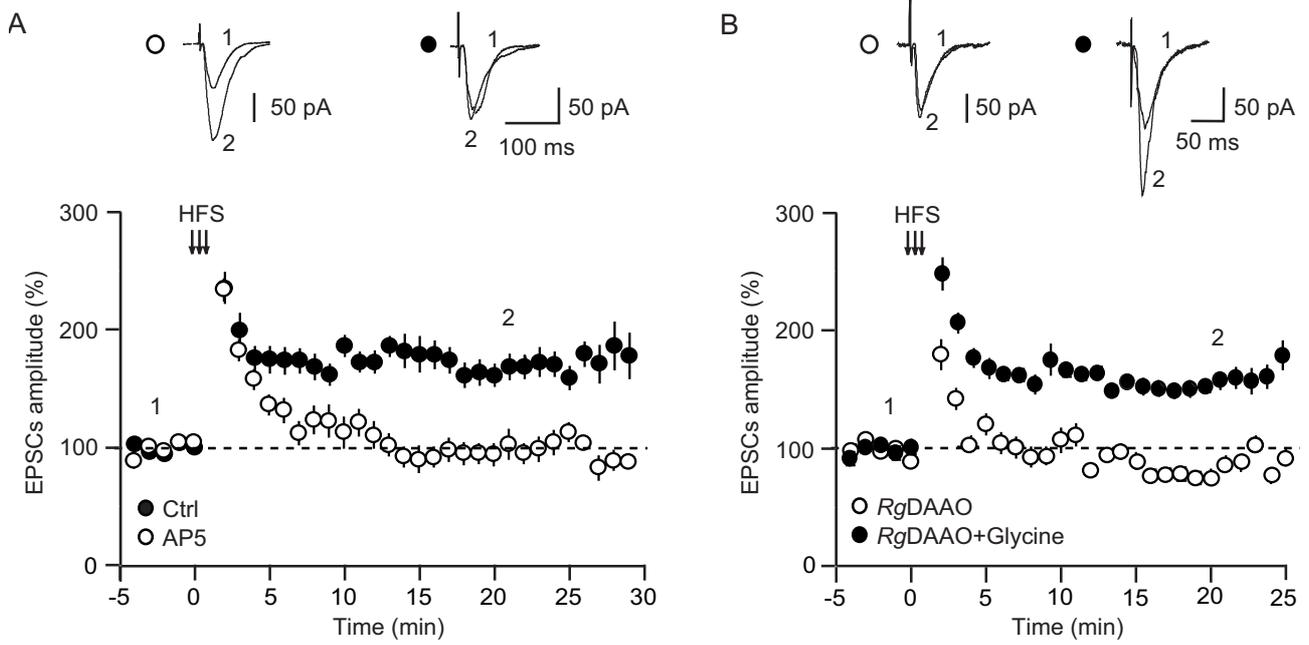


Figure 4: Pyramidal cell LTP depends on the saturation level of glycine site of NMDA receptors. A) LTP is induced in layers V/VI pyramidal cells by high frequency stimulation (HFS). This LTP is NMDA dependent since it is blocked by application of AP5. B) LTP is suppressed if slices are incubated in *RgDAAO* and is maintained in slices incubated in *RgDAAO* and glycine.

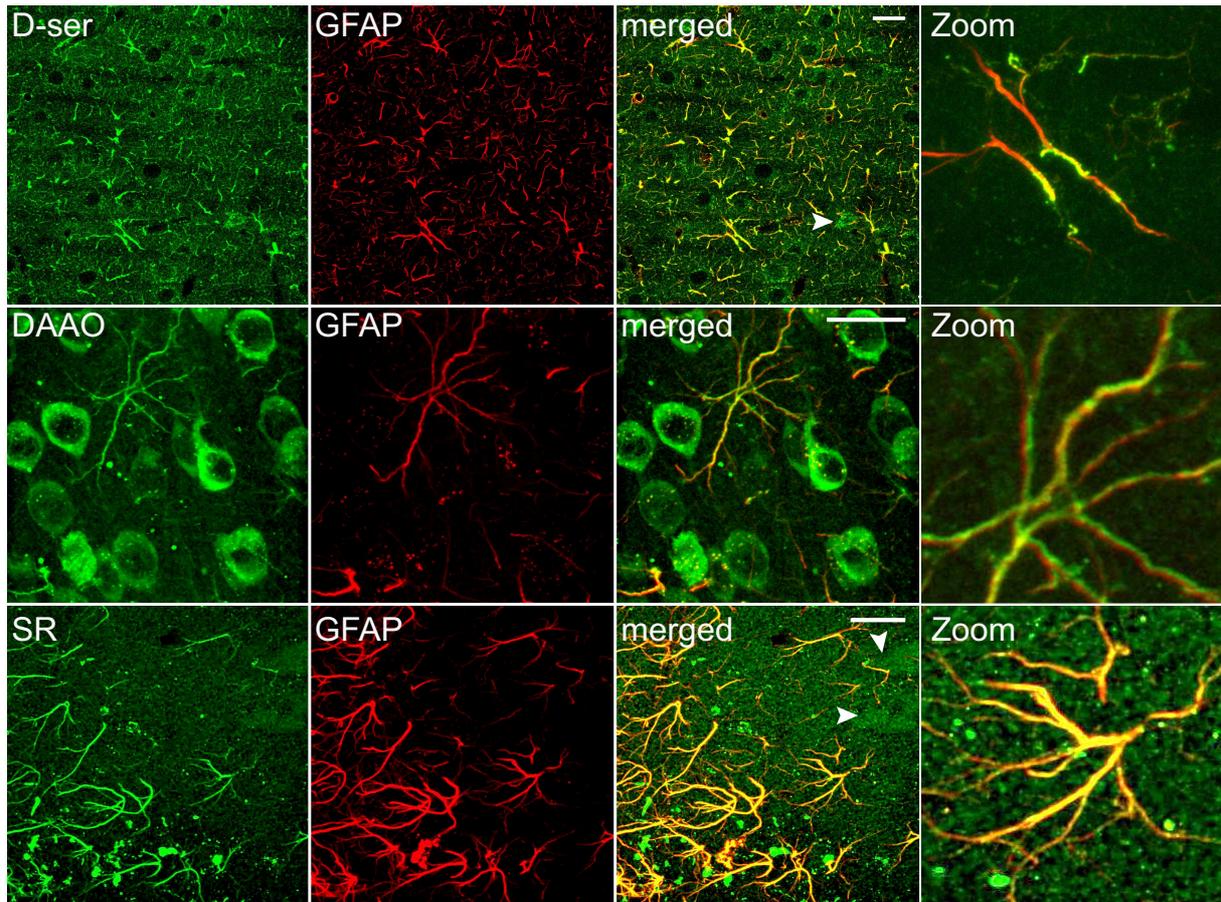


Figure 5: Cellular distribution of D-serine metabolism in the PFC layers V/VI. Double-immunostainings showing the cellular distribution of GFAP (1/1000, Alexa 546) versus D-serine (1/1000; Alexa 488, first row), versus DAAO (1/1000, Alexa 488, second row), and serine racemase (1/1000, Alexa 488, third row). Scales: 25 μ m. Arrowheads highlight the presence of labelled soma of neurons.

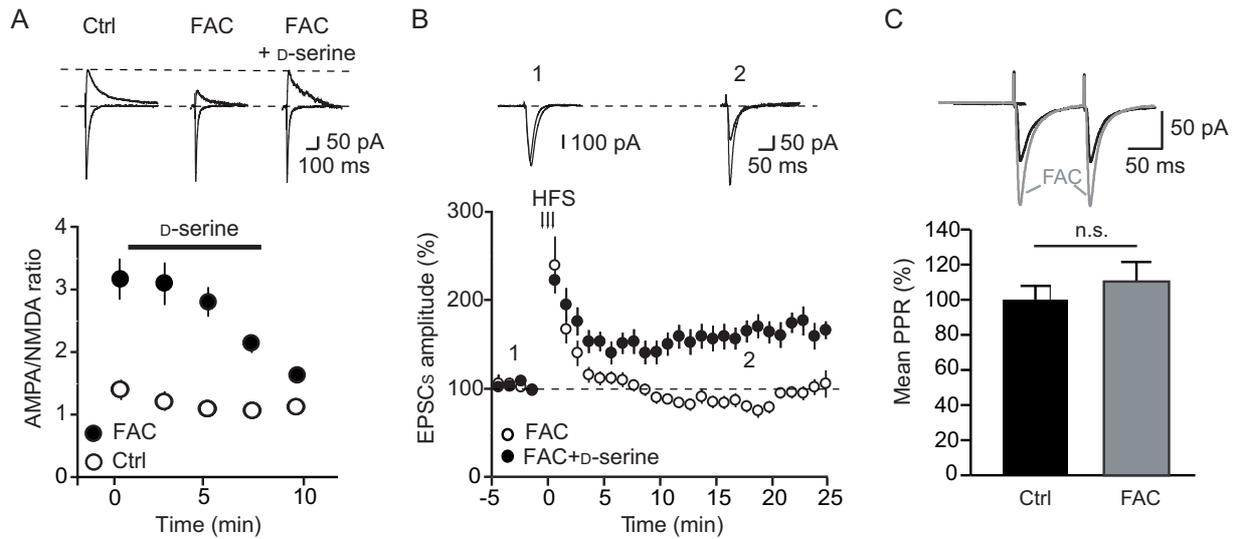


Figure 6: Glial cells control NMDA receptors in layers V/VI pyramidal cells. A) In slices incubated in FAC (a metabolic glial inhibitor), AMPA/NMDA peak current ratio is strongly increased. This effect was abolished by further application of 100 μ M D-ser (black bar). B) NMDA dependent LTP is under glial control. Indeed, LTP is suppressed in slices incubated in FAC and maintained in slices incubated in FAC plus D-ser. C) Paired pulse ratio (PPR) is not affected when glia is functionally eliminated by FAC.

Partie 2, interaction entre systèmes dopaminergique et glutamatergique dans le cortex préfrontal de rat.

L'objectif est de caractériser le rôle de la D-sérine dans la modulation par la dopamine de la transmission glutamatergique et de l'excitabilité des neurones pyramidaux du PFC.

La dopamine, par l'intermédiaire de ses récepteurs, est un modulateur de la transmission glutamatergique dans le PFC. Elle module notamment l'activité des récepteurs NMDA localisés sur les neurones pyramidaux de manière différentielle, en fonction de la concentration présente à la synapse et du type de récepteurs de la dopamine impliqués. En effet, Zheng (Zheng et al. 1999) et ses collaborateurs ont montré une augmentation des EPSCs NMDA pour des faibles concentrations de dopamine (10 μ M). Par opposition, une forte concentration de dopamine (100 μ M) diminue les EPSCs NMDA. Au cours de la première partie de ma thèse, nous avons clairement démontré que dans le PFC le récepteur NMDA à la synapse requiert pour son activation la liaison du glutamate et d'un coagoniste, la D-sérine. L'hypothèse que nous proposons ici est que la D-sérine soit le relais entre système dopaminergique et glutamatergique. Pour étayer cette hypothèse, nous avons réalisé des études électrophysiologiques en patch-clamp, en configuration cellule entière et en mode voltage imposé sur des tranches de cortex préfrontal de rats adultes (2-3 mois). Dans un premier temps nous nous sommes attachés à reproduire l'effet biphasique de la dopamine sur la transmission glutamatergique, relaté dans la littérature. Deuxièmement, nous nous sommes intéressés au rôle de la D-sérine dans les interactions entre les deux systèmes. Finalement, nous avons déterminé le rôle des différents types de récepteurs de la dopamine dans la modulation de la transmission glutamatergique et leurs interactions avec de la D-sérine.

2.1 Effet modulateur de la dopamine sur la transmission glutamatergique et implication de la D-sérine.

Afin de déterminer les effets modulateurs de la dopamine sur les EPSCs NMDA, nous avons appliqué différentes concentrations de dopamine sur des tranches de

cortex préfrontal. La stimulation des couches I/II du PFC permet de générer des courants NMDA sur les neurones pyramidaux des couches V/VI en patch-clamp en configuration cellule entière. Les courants NMDA sont isolés grâce à l'application en bain de picrotoxine (50 μ M), antagoniste des récepteurs GABA-A, et de NBQX, un antagoniste des récepteurs AMPA.

2.1.1 L'effet biphasique de la dopamine sur la transmission glutamatergique implique la D-sérine.

L'application en bain de dopamine à une concentration de 1 μ M augmente de $38,69 \pm 6,88$ (n=11, p<0,001) les EPSCs NMDA (Figure 27 A). Cet effet est réversible puisque le lavage de la dopamine permet de rétablir l'amplitude des EPSCs NMDA telle que observée avant l'application de celle-ci. Afin de déterminer le rôle de la D-sérine dans les interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique, nous avons réalisé une occlusion du site glycine des récepteurs NMDA en ajoutant de la D-sérine à une concentration saturante (100 μ M). En effet, si la D-sérine n'est pas impliquée, cette occlusion ne devrait pas modifier l'effet potentialisateur de la dopamine sur les EPSCs NMDA. Or, l'application de dopamine n'augmente plus suite à l'occlusion du site glycine, que de $15,56 \pm 3,47$ % (n=8, p<0,05) les EPSCs NMDA (Figure 27B). Ces résultats suggèrent donc que la D-sérine est impliquée dans les modulations par la dopamine de la transmission glutamatergique. Pour valider cette hypothèse, nous avons dégradé spécifiquement la D-sérine endogène grâce à la *RgdAAO*. L'application de dopamine dans ces conditions n'as plus d'effet sur les EPSCs NMDA ($5,35 \pm 5,96$ %, n=7, p=non significatif, Figure 27C). L'ensemble de ces résultats, d'une part confirme l'effet modulateur positif à faible concentration de la dopamine sur les EPSCs NMDA. D'autre part, ils mettent en avant le rôle central de la D-sérine dans ces modulations.

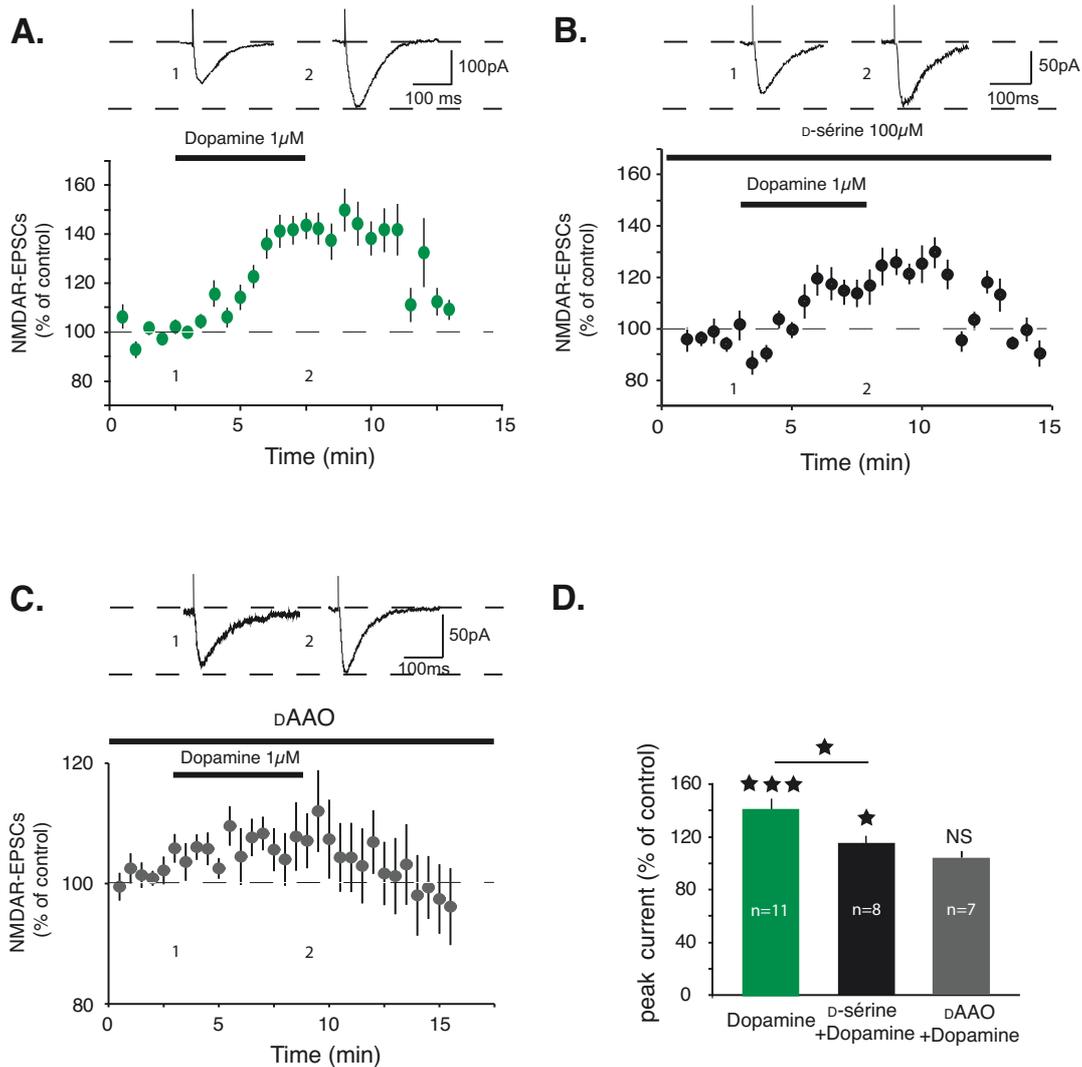


Figure 27 : La dopamine à faible concentration (1 μM) module positivement les EPSCs NMDA via la D-sérine. A. L'application de dopamine à 1 μM augmente les EPSCs NMDA ($n=11$, $p<0,001$). B. L'occlusion du site glycine des récepteurs NMDA, par une concentration saturante de D-sérine (100 μM) inhibe 50 % de l'effet de la dopamine. Dans ces conditions l'augmentation des EPSCs NMDA suite à l'application de dopamine n'est plus que de $15,56 \pm 3,47$ % ($n=8$, $p<0,05$). C. Afin de confirmer le rôle de la D-sérine, nous avons incubé les tranches pendant 45 min dans de la RgdAAO (0,5U/ml). Dans ces conditions, l'application de dopamine n'a plus d'effet sur les EPSCs NMDA ($n=7$, $p= \text{N.S}$) confirmant ainsi le rôle modulateur de la dopamine sur les EPSCs NMDA et via la D-sérine. D. Histogramme illustrant les effets de la dopamine seule ou en combinaison avec de la D-sérine ou la RgdAAO.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché les effets d'une concentration de dopamine à une valeur de 10 μM , le but étant de tester l'effet biphasique de la dopamine décrit dans la littérature. Lors de l'application de dopamine à cette concentration les EPSCs NMDA sont fortement diminués ($-45,35 \pm 7,38$ %, $n= 7$, $p<0,001$, Figure 28A). L'occlusion du site glycine par la D-sérine à une concentration

saturante de $100 \mu\text{M}$ inhibe une partie de l'effet modulateur négatif de la dopamine ($-16,79 \pm 6,18 \%$, $n=6$, $p<0,001$, Figure 28B). L'incubation au préalable des tranches de PFC dans la *RgDAAO* qui dégrade spécifiquement la D-sérine réduit d'environ 50 % l'effet inhibiteur de la dopamine ($-18,71 \pm 6,66 \%$, $n=5$, $p<0,001$, figure 28C). Il est intéressant de noter que l'effet modulateur de la dopamine est identique lorsqu'elle est appliquée en présence de D-sérine ou *RgDAAO*.

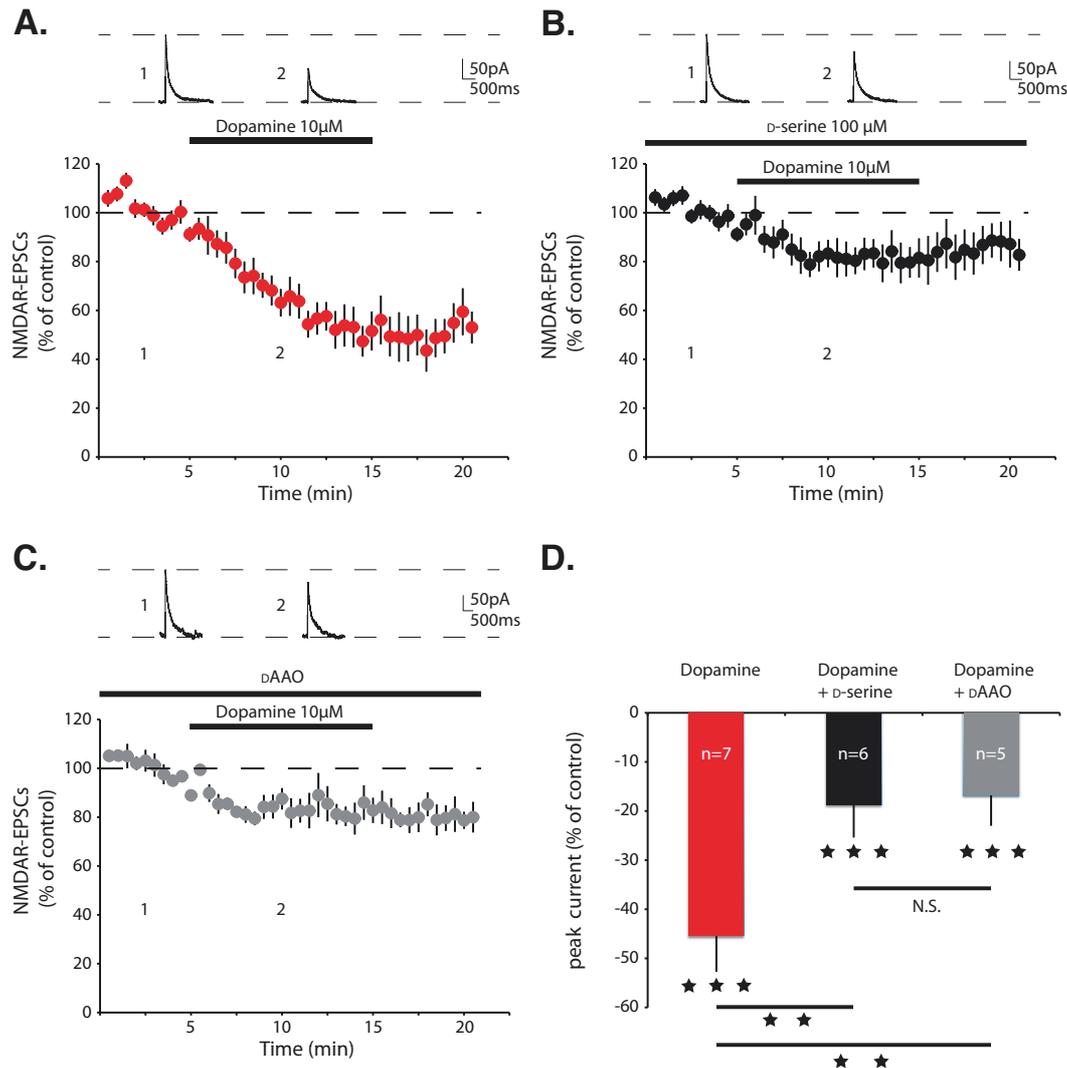


Figure 28 : La dopamine à forte concentration ($10 \mu\text{M}$) module négativement les EPSCs NMDA via la D-sérine. A. L'application de dopamine à $10 \mu\text{M}$ diminue les EPSCs NMDA ($n=7$, $p<0,001$). B. L'occlusion du site glycine des récepteurs NMDA, par une concentration saturante de D-sérine ($100 \mu\text{M}$) inhibe une partie de l'effet de la dopamine. Dans ces conditions la diminution des EPSCs NMDA suite à l'application de dopamine n'est plus que de $16,79 \pm 6,18 \%$ ($n=6$, $p<0,001$). C. Afin de confirmer le rôle de la D-sérine, nous avons incubé les tranches pendant 45 min dans de la *RgDAAO* ($0,5 \text{U/ml}$). Dans ces conditions, l'application de dopamine diminue les EPSCs NMDA ($-18,71 \pm 6,66 \%$, $n=7$, $p<0,001$) confirmant ainsi le rôle modulateur de la dopamine sur les EPSCs NMDA et via la D-sérine. D. Histogramme illustrant les effets de la dopamine seule ou en combinaison avec de la D-sérine ou la *RgDAAO*.

L'ensemble de nos résultats sur la transmission glutamatergique confirme l'effet biphasique de la dopamine, relaté dans la littérature notamment par Zheng et ses collaborateurs (Zheng et al. 1999). Toutefois, nous pouvons constater un décalage vers la gauche des doses de dopamine potentialisatrice et inhibitrice dans le cas de notre étude par rapport à l'étude de Zheng. En effet, ces auteurs montrent que l'effet potentialisateur est obtenu avec 10 μM de dopamine dose pour laquelle nous obtenons une inhibition des EPSCs-NMDA. Dans notre étude, l'effet potentialisateur de la dopamine est obtenu à 1 μM . Il est intéressant de noter que Zheng et ses collaborateurs génèrent des courants NMDA en appliquant localement par 'puffs' du NMDA (10 μM). Dans notre cas, les EPSCs-NMDA sont évoqués par la stimulation des couches I/II. L'application locale de NMDA par 'puffs' active d'une part les récepteurs postsynaptiques synaptiques mais aussi extrasynaptiques. Ces récepteurs NMDA extrasynaptiques peuvent donc participer significativement à l'augmentation de l'amplitude du courant NMDA lors du 'puff' tout en étant moins sensibles aux effets de la dopamine. En effet, il a été démontré que l'application de NMDA par 'puff' active les récepteurs synaptiques mais également les récepteurs extrasynaptiques (Harris and Pettit 2007). Donc, il est fort probable que les courants enregistrés dans l'étude de Zheng résultent de l'activation des 'pools' de récepteurs NMDA extrasynaptiques et synaptiques. Toutefois, on ne connaît pas à ce jour les différences pouvant exister entre ces deux types de récepteurs et leur(s) modulation (s) par la dopamine. Dans le cas de notre étude, les stimulations générées dans les couches I/II du PFC permettent d'activer majoritairement les récepteurs NMDA synaptiques. D'autre part, la présence de récepteurs NMDA présynaptiques a été démontrée dans différentes structures comme le cortex visuel (Corlew et al. 2007), l'hippocampe (Jourdain et al. 2007), l'amygdale (Humeau et al. 2003) ou le cervelet (Duguid and Smart 2004). Ces récepteurs NMDA présynaptiques ont notamment pour fonction d'augmenter la probabilité de libération des neurotransmetteurs. Il est possible que l'application de NMDA par 'puffs' augmente la probabilité de libération de glutamate ce qui pourrait expliquer le décalage de la courbe de l'effet biphasique de la dopamine qui a été observé par Zheng et ses collaborateurs. L'augmentation de la libération de glutamate induite lors de l'activation par 'puffs' des récepteurs NMDA présynaptiques pourrait compenser les effets inhibiteurs de la dopamine sur

les récepteurs NMDA synaptiques. Dans notre cas, les EPSCs-NMDA générés par stimulations électriques des couches I/II n'impliqueraient pas ou peu ce relai présynaptique. Cette dernière hypothèse pourrait être testée lors de l'enregistrement du rapport de courants par la technique de paire pulse qui permet une mesure des effets présynaptiques versus postsynaptiques. Enfin, une dernière considération à mettre en évidence est l'âge des animaux utilisés dans les différentes études. En effet, notre étude porte sur des animaux matures de 2-3 mois alors que l'étude de Zheng (Zheng et al. 1999) utilise des animaux à peine sevrés de moins d'un mois dont le cortex préfrontal est en pleine maturation. Il est remarquable de noter que la présence de récepteurs présynaptiques diminue avec la maturation du système nerveux pour ne plus être que secondaire (Corlew et al. 2007).

L'autre fait remarquable de notre étude est la démonstration de l'implication majeure de la D-sérine dans la modulation de la transmission glutamatergique par la dopamine. Cette démonstration est basée sur l'utilisation de la *RgdAAO*, une enzyme qui dégrade spécifiquement la D-sérine (Pollegioni et al. 2007) sans affecter la dopamine. La poursuite de cette étude a consisté dès lors à étudier le rôle des différents récepteurs de la dopamine dans les modulations de la transmission glutamatergique. La dopamine peut se lier sur deux types de récepteurs aux effets opposés, les récepteurs de type D1 et les récepteurs de type D2 ((Tseng and O'Donnell 2004; Maggio et al. 2009).

2.1.2 Les récepteurs de type D2 modulent la transmission synaptique via la D-sérine.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux récepteurs de type D2. Notre attention s'est focalisée sur ces récepteurs car ils sont particulièrement impliqués dans la schizophrénie. En effet, les récepteurs de type D2 sont à la base de l'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie (Voir introduction chapitre 1.4.3). Pour démasquer le rôle de ces récepteurs dans la modulation du système glutamatergique, nous avons appliqué du quinpirole (10 μ M), un agoniste des récepteurs de type D2 sur des tranches de PFC. L'application de quinpirole entraîne une diminution de $36,88 \pm 6,05$ % (n=10, p<0,001, Figure 29A) de l'amplitude des

EPSCs NMDA (Figure XA). L'occlusion du site glycine du récepteur NMDA par la D-sérine à une concentration saturante de 100 μM réduit d'environ 50 % l'effet inhibiteur du quinpirole ($18,6 \pm 4,86 \%$, $n=8$, $p<0,01$, figure 29B).

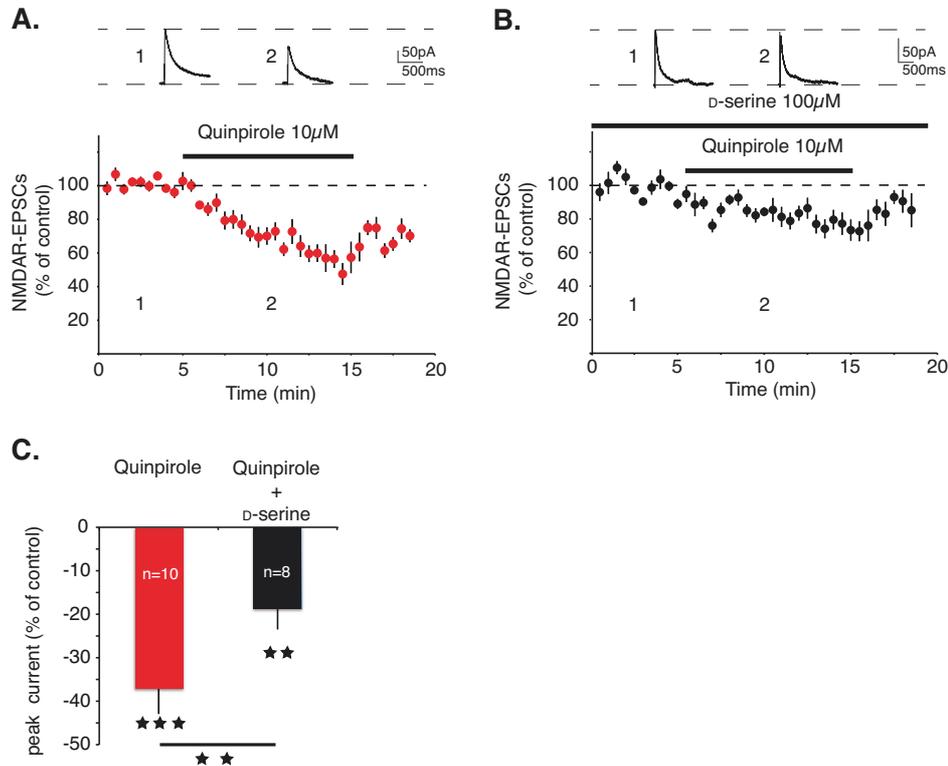


Figure 29 : Les récepteurs de type D2 modulent négativement les EPSCs NMDA via la D-sérine.

A. L'application de quinpirole, agoniste des récepteurs de type D2, à 10 μM diminue les EPSCs NMDA ($n=10$, $p<0,001$). B. L'occlusion du site glycine des récepteurs NMDA, par une concentration saturante de D-sérine (100 μM) réduit d'environ 50 % l'effet du quinpirole. Dans ces conditions la diminution des EPSCs NMDA suite à l'application de quinpirole n'est plus que de $18,6 \pm 4,86 \%$ ($n=8$, $p<0,01$). C. Histogramme illustrant les effets du quinpirole seule ou en combinaison avec de la D-sérine.

Il est intéressant de noter que ces résultats sont identiques à ceux obtenus lors de l'application de dopamine à 10 μM seule ou en combinaison avec la D-sérine saturante. La dopamine à une concentration de 10 μM agirait donc principalement sur les récepteurs de type D2 d'où son effet inhibiteur sur les réponses NMDA. Ces résultats sont en accord avec la littérature, notamment avec les travaux de Zheng (Zheng et al. 1999). En effet, ils ont pu démontrer que la dopamine à forte concentration, qui module négativement la transmission glutamatergique, agit par l'intermédiaire des récepteurs de type D2. Pour arriver à cette conclusion, ils ont

appliqué un antagoniste des récepteurs de type D2, l'eticlopride. Suite à cela, l'application d'une forte concentration de dopamine (100 μ M) n'a plus d'effet. De plus, l'application d'un antagoniste des récepteurs de type D1 ne bloque pas les effets inhibiteurs de la dopamine à 100 μ M. Au cours de cette même étude, les auteurs ont pu démontrer que la dopamine à faible concentration, qui module positivement la transmission glutamatergique, agit par l'intermédiaire des récepteurs de la dopamine de type D1. Ces résultats sont identiques à ceux que nous avons obtenus.

Suite à cela, nous nous sommes intéressés aux récepteurs de la dopamine D3. Les récepteurs D3 appartiennent à la famille des récepteurs de type D2. Les récepteurs D3 sont l'objet de toutes les attentions, particulièrement pour leur implication possible dans les psychoses ainsi que dans le phénomène d'addiction (Richtand and McNamara 2008; Heidbreder and Newman 2010). Nous avons déterminé leurs rôles dans les interactions entre système dopaminergique et glutamatergique. L'application de PD128907 (1 μ M), un agoniste spécifique des récepteurs D3, diminue fortement les EPSCs-NMDA ($-39,67 \pm 8,07$ %, $n=7$, $p<0,001$, figure 30A). L'occlusion du site glycine du récepteur NMDA par la D-sérine saturante, réduit de moitié l'effet inhibiteur du PD128907 ($-21,66 \pm 5,56$ %, $n=7$, $p<0,01$, figure 30B). Finalement, afin de s'assurer que ces effets impliquent bien, les récepteurs D3 nous avons appliqué un antagoniste spécifique des récepteurs D3 le S33084 développé par les laboratoires Servier pour le traitement des psychoses et des troubles cognitifs. Dans ces conditions, le PD128907 n'as plus d'effet sur les EPSCs NMDA ($0,09 \pm 10,58$ %, $n=6$, $p=$ N.S, figure 30C). Ces résultats sont strictement identiques à ceux observés lors de l'application de quinpirole, qui cible les récepteurs D2, D3 et D4. Il semble donc que les effets observés lors de l'application de fortes concentrations de dopamine impliquent principalement les récepteurs D3. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant d'appliquer le S33084, antagoniste spécifique des récepteurs D3 en présence de quinpirole. Cette approche nous permettrait de déterminer encore plus précisément la contribution des récepteurs D3 versus les récepteurs D2 et D4.

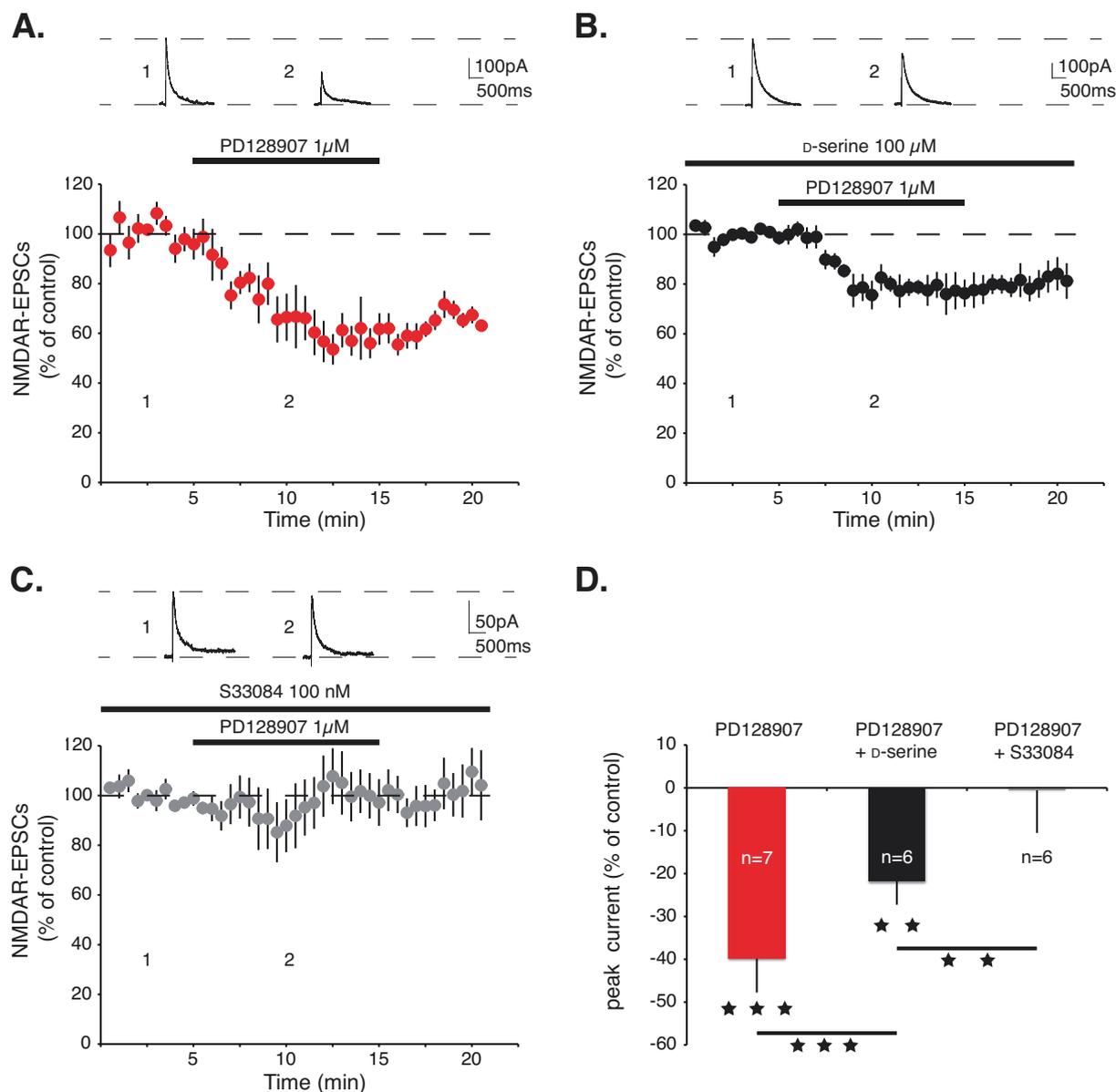


Figure 30 : Les récepteurs de D3 modulent négativement les EPSCs NMDA via la D-sérine. A. L'application de PD128907, agoniste des récepteurs D3, à 1 μ M diminue les EPSCs NMDA (n=7, p<0,001). B. L'occlusion du site glycine des récepteurs NMDA, par une concentration saturante de D-sérine (100 μ M) réduit d'environ 50 % l'effet du PD128907. Dans ces conditions la diminution des EPSCs NMDA suite à l'application de PD128907 n'est plus que de $-21,66 \pm 5,5$ % (n=6, p<0,01). C. L'application de S33084, antagoniste des récepteurs D3, bloque totalement l'effet du PD128907. D. Histogramme illustrant les effets du PD128907 seule ou en combinaison avec de la D-sérine.

Ces résultats indiquent clairement que la dopamine à forte concentration recrute principalement les récepteurs de type D2 et plus particulièrement les récepteurs D3. Par ailleurs, on constate que l'application de quinpirole et de PD128907 module négativement l'amplitude des EPSCs NMDA, mais que ces effets ne sont pas réversés lorsque l'on perfuse avec de l'aCSF normal (sans agoniste). Le lavage de

ces deux composés ne rétablissent pas l'amplitude des EPSCs NMDA aux valeurs contrôles observées avant leur application. Le quinpirole et le PD128907 suite à l'activation des récepteurs D2 et D3 respectivement, activent plusieurs voies de signalisation intracellulaire au niveau des neurones postsynaptiques. La première voie est l'inhibition de la production de l'AMPc et donc l'inactivation de la PKA ce qui a deux principales conséquences. Tout d'abord, cela provoque l'activation de la phosphatase PP1. Or, La PP1 déphosphoryle la sous unité NR1 du récepteur NMDA entraînant une diminution de l'activité de ces récepteurs (Tingley et al. 1997; Westphal et al. 1999; Wang et al. 2003). De plus, La CaMKII est activée par la PKA; or il a été montré que l'activation des récepteurs de type D2 (et en particulier D4) entraîne l'internalisation des récepteurs NMDA, internalisation qui est dépendante de l'inhibition de la CaMKII (Wang et al. 2003). Par ailleurs, cette internalisation entraîne une diminution de l'expression surfacique des récepteurs NMDA à la synapse. D'autre part, il a été montré que l'activation des récepteurs de type D2 inhibe l'activité des récepteurs NMDA via la transactivation de récepteurs à tyrosine kinase (RTK) (Kotecha et al. 2002; Ferguson 2003). Les RTK augmentent la $[Ca^{2+}]_i$ par l'intermédiaire des récepteurs IP3 présents au niveau du réticulum endoplasmique. Cette augmentation $[Ca^{2+}]_i$ conduit à une inactivation des récepteurs NMDA par la calmoduline. En conclusion, l'activation des récepteurs de type D2 inhibe les récepteurs NMDA de trois manières : déphosphorylation, internalisation et inhibition par la calmoduline.

Il est remarquable de noter que la dopamine n'agit pas uniquement sur les neurones. En effet, la présence de récepteurs D2 a été démontrée sur les astrocytes dans le PFC de singe (Khan et al. 2001). D'autre part, l'application de dopamine sur des astrocytes en culture a pour effet d'augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ (Parpura and Haydon 2000). Nous avons montré dans la première partie de ce travail de thèse que la D-sérine est non seulement le co-agoniste endogène des récepteurs NMDA synaptique mais aussi que cet acide aminé gouverne les interactions entre dopamine et glutamate. Or, nous avons montré que la source de D-sérine endogène est très majoritairement gliale. Cette origine astrocytaire est due à la présence de son enzyme de synthèse, la SR. Toutefois, les mécanismes gouvernant la modulation de

la libération de D-sérine sont à l'heure actuelle, mal connus. Une hypothèse est que les récepteurs de la dopamine puissent moduler la synthèse de D-sérine. La SR est ancrée aux récepteurs AMPA par l'intermédiaire de la protéine GRIP. Or, pour être active, la SR nécessite d'être libre dans le cytosol (Baumgart and Rodriguez-Crespo 2008). C'est l'activation des récepteurs AMPA phosphorylés qui va permettre à la SR d'être libérée. L'activation des récepteurs D2 par l'intermédiaire de la PKA diminue le niveau de phosphorylation des récepteurs AMPA (Alt et al. 2006) empêchant ainsi la libération et donc l'activation de la SR, ce qui aurait pour effet de diminuer la production de D-sérine. A contrario, les récepteurs de type D1 phosphorylent les récepteurs AMPA, et augmenteraient ainsi l'activité de la SR. Néanmoins, la présence des récepteurs de type D1 sur les astrocytes n'est pas connue.

Toutefois, la présence de la SR uniquement astrocytaire reste à l'heure actuelle controversée. En effet, il a été montré par hybridation *in situ* dans le cerveau de rat, que les ARNm de la SR sont majoritairement exprimés dans les neurones (Yoshikawa et al. 2007). Au niveau moléculaire, la SR et la D-sérine sont retrouvées dans les astrocytes et les neurones chez la souris (Ding et al. 2010). Enfin, il a été montré que la D-sérine peut être libérée par les neurones, selon un mécanisme non exocytotique (Rosenberg et al. 2010). Il est donc tout à fait plausible que les mécanismes que nous venons de présenter dans le paragraphe précédent, existent aussi dans les neurones. Cependant, nous avons montré que la SR est uniquement gliale dans le PFC. En effet, seules la D-sérine et la DAAO sont présentes dans les deux types cellulaires. Notre hypothèse est que la D-sérine pourrait être uniquement recapturée et non synthétisée par les neurones, afin d'y être dégradée par la DAAO ou éventuellement libérée.

En conclusion, nous avons montré que les effets de la dopamine à forte concentration impliquent les récepteurs de type D2 et plus particulièrement D3. Nous formulons l'hypothèse que les effets de la dopamine impliquent deux voies non exclusives. Dans le premier cas, la dopamine agit directement sur les neurones et diminue ainsi l'activité des récepteurs NMDA. Dans le second cas, la dopamine agit indirectement en impliquant un relais glial. Des récepteurs D2 seraient présents sur les astrocytes, dont l'activation diminuerait la synthèse et/ou la libération de D-sérine, modulant par la même la transmission glutamatergique.

2.1.3 Les récepteurs D1 modulent la transmission synaptique.

Finalement, nous nous sommes intéressés au rôle des récepteurs de type D1 dans les effets potentialisateurs de la dopamine sur la transmission glutamatergique. Actuellement, ce travail est toujours en cours et les résultats présentés ne sont donc pas définitifs. L'application en bain de SKF81297, un agoniste des récepteurs de type D1 augmente l'amplitude des récepteurs NMDA ($101,23 \pm 46,23 \%$, $n=4$, $p<0,001$, Figure 31).

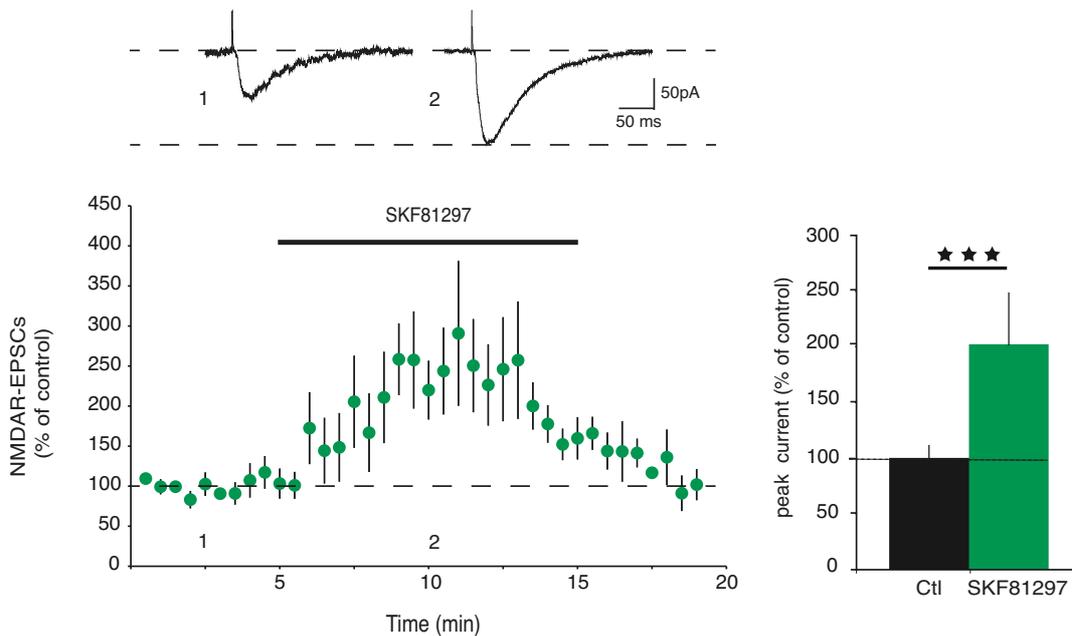


Figure 31 : Les récepteurs de type D1 modulent positivement les EPSCs NMDA. A. L'application de SKF81297, agoniste des récepteurs de type D1, à $10\mu\text{M}$ augmente les EPSCs NMDA ($n=4$, $p<0,001$). B. Histogramme illustrant les effets du SKF81297.

Ces résultats préliminaires tendent à confirmer que la dopamine à faible concentration implique uniquement les récepteurs de type D1. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Zheng et al. 1999), où plusieurs mécanismes ont été proposés expliquant cette augmentation d'amplitude. Tout d'abord, l'activation des récepteurs D1 active la PKA. La PKA agit de deux manières (Snyder et al. 1998). La première consiste en une inhibition de la phosphatase PP1, qui n'a donc plus la capacité de déphosphoryler la sous unité NR1 des récepteurs NMDA. La deuxième consiste en la phosphorylation de la sous unité NR1. Dans les deux cas ces mécanismes conduisent à une augmentation du niveau de phosphorylation du récepteur NMDA et donc de son activité. La PKA n'est pas la seule kinase impliquée

dans la modulation des EPSCs NMDA. En effet, il a été montré que la PKC est aussi indispensable à la potentiation des courants NMDA en inhibant notamment la calmoduline (Chen et al. 2004). Par ailleurs, l'activation des récepteurs D1 augmente l'expression surfacique des récepteurs NMDA à la synapse par l'intermédiaire de la protéine kinase FYN (Dunah and Standaert 2001). Cette voie est indépendante de l'activation de DARPP-32, protéine de la voie de signalisation des récepteurs de la dopamine (Dunah et al. 2004).

Afin de finaliser ces résultats, il serait intéressant de voir l'effet d'une occlusion du site glycine par la D-sérine saturante. Nous nous attendons à ce que cette occlusion du site glycine réduise une partie de l'effet du SKF81297 comme cela a été montré pour la dopamine à 1 μ M, démontrant l'implication, et ce pour la première fois, de la D-sérine dans les interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique. Par ailleurs, très récemment des souris dont le gène de la SR a été invalidé, ont été mises à notre disposition. Ces souris présentent des niveaux de D-sérine fortement réduits par rapport aux souris sauvages. Dans ces conditions, nous projetons de tester les effets modulateurs de la dopamine sur la transmission glutamatergique afin de confirmer l'implication de la D-sérine. En effet, chez les souris KO SR la modulation de la transmission glutamatergique par la dopamine devrait être réduite ou absente par rapport aux souris sauvages.

En conclusion, nous venons de voir que la dopamine gouverne la transmission synaptique glutamatergique en modulant les récepteurs NMDA de manière biphasique et que la D-sérine est au cœur de ces interactions. Plus précisément, la dopamine à faible concentration (1 μ M) module positivement l'amplitude des EPSCs NMDA en augmentant la libération de D-sérine et implique les récepteurs de type D1. A contrario, la dopamine à forte concentration (10 μ M) module négativement les EPSCs NMDA notamment en diminuant la libération de D-sérine et implique les récepteurs de type D2 et plus particulièrement D3. L'ensemble de ces résultats sont schématisés dans la Figure 32.

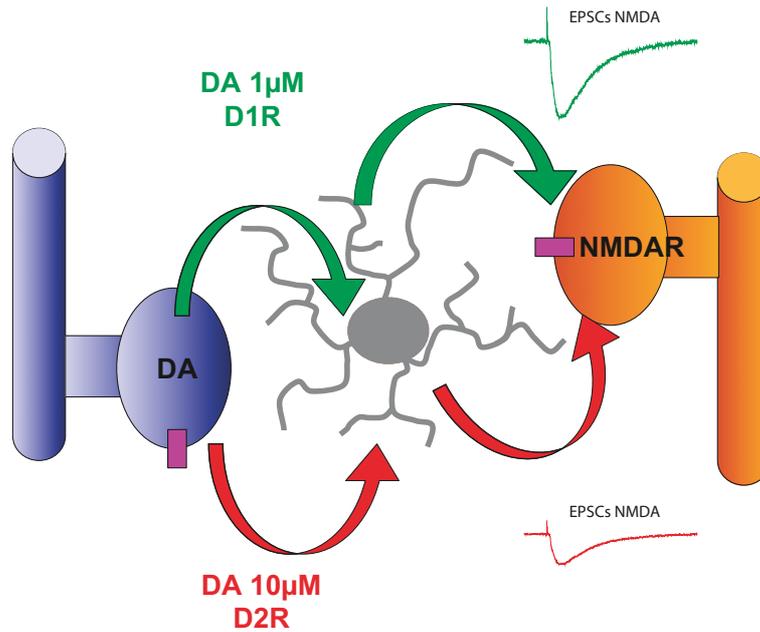


Figure 32 : Schématisation des effets de la dopamine sur la transmission synaptique des neurones pyramidaux du PFC.

2.2 Effet modulateur de la dopamine sur l'excitabilité des neurones pyramidaux du PFC et implication de la D-sérine.

Nous venons de voir que la dopamine module la transmission glutamatergique via la D-sérine. Ces modulations par la dopamine du système glutamatergique se produisent à d'autres niveaux. En effet, il a été montré que la dopamine gouverne l'excitabilité neuronale et en particulier des cellules pyramidales, en fonction du type de récepteur de la dopamine impliqué. L'application d'agonistes des récepteurs de type D1 augmente l'excitabilité des neurones pyramidaux dans le PFC (Wang and O'Donnell 2001). A contrario, l'application d'agonistes des récepteurs de type D2 diminue l'excitabilité (Tseng and O'Donnell 2004). De plus, l'implication des récepteurs NMDA a été démontrée puisque l'application de NMDA augmente également l'excitabilité neuronale (Wang and O'Donnell 2001; Tseng and O'Donnell 2004). Nous pouvons légitimement émettre l'hypothèse que la D-sérine puisse avoir un rôle dans ces modulations par la dopamine de l'excitabilité neuronale.

Pour déterminer le rôle précis de la D-sérine, nous avons appliqué de la dopamine à faible concentration sur des tranches de cortex préfrontal. Nous avons

enregistré les neurones pyramidaux des couches V/VI en mode courant imposé et en configuration cellule entière. Nous nous sommes intéressés à plusieurs paramètres : le nombre de potentiels d'action (PA), le délai avant le premier PA, le potentiel de repos de la cellule et finalement la résistance membranaire.

L'application de dopamine à 1 μM augmente très fortement l'excitabilité neuronale, puisqu'en situation contrôle il y a $1,25 \pm 0,25$ (n=4) PA et suite à l'application de dopamine il y a $5,08 \pm 1,41$ (n=4, Figure 33A) PA, ce qui représente une augmentation de 406,4 %. Il est intéressant de noter que l'application de dopamine entraîne une dépolarisation de la cellule ($-65,33 \pm 2,84$ mV vs $-58,02 \pm 2,76$ mV n=4, Figure 33A) ainsi qu'une diminution du délai d'apparition du premier PA ($186,11 \pm 36,59$ ms vs $78,90 \pm 18,37$ ms, Figure 33A). Aucune différence n'a été constatée ni au niveau de la résistance d'entrée ($130,46 \pm 13,48$ m Ω vs $145,25 \pm 16,52$ m Ω n=4, Figure 33A) ni sur l'amplitude des PA ($63,28 \pm 2,77$ mV vs $61,01 \pm 3,41$ mV n=4, Figure 33A). On constate donc que la dopamine module positivement l'excitabilité neuronale, il reste à déterminer le rôle de la D-sérine dans ces modulations.

Pour cela nous avons incubé les tranches avec la RgDAAO (0,5U/ml) pendant 45 min. Dans ces conditions, l'application de dopamine augmente le nombre de PA ($2,99 \pm 0,23$ vs $4,99 \pm 0,95$, n=4, Figure 33B) mais son effet excitateur est réduit car l'augmentation n'est plus que de 166,8% (Figure 33B). L'effet modulateur de la dopamine à 1 μM sur l'excitabilité neuronale est induit en grande partie par la D-sérine, puisque la dégradation de la D-sérine endogène par la RgDAAO réduit l'effet potentialisateur de la dopamine. Une diminution du délai d'apparition du premier PA a été aussi mesurée ($118,09 \pm 10,55$ ms vs $67,04 \pm 20,62$ ms, n=4, Figure 33B). Aucune modification ni du potentiel de repos ($-64,88 \pm 1,66$ mV vs $-64,08 \pm 1,04$ mV, n=4, Figure 33B), ni de la résistance d'entrée ($120,41 \pm 11,8$ m Ω vs $119,79 \pm 11,42$ m Ω , n=4, Figure 33B), ni de l'amplitude des PA ($69,28 \pm 3,28$ mV vs $69,66 \pm 5,6$ mV, n=4, Figure 33B) n'a été observée.

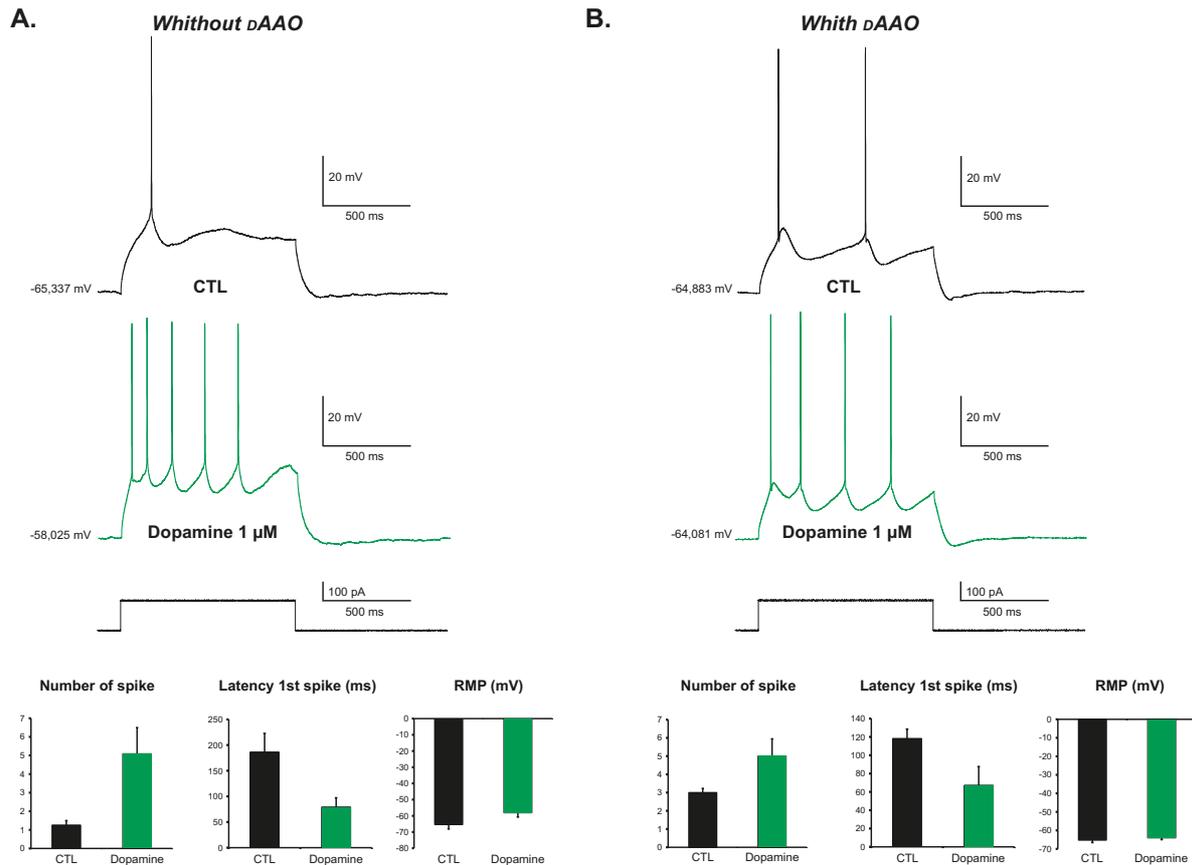


Figure 33 : La dopamine module l'excitabilité neuronale via la D-sérine. La dopamine à 1 μM augmente le nombre de potentiel d'action de plus de 400 % tout en réduisant le délai d'apparition du premier PA et dépolarise la cellule. B. En présence de *RgDAAO*, la dopamine module positivement l'excitabilité neuronale mais celle-ci est en grande partie inhibée par la présence de *RgDAAO*.

Suite à cela, nous nous sommes intéressés aux effets de la dopamine à une concentration de 10 μM. L'application de dopamine à 10 μM diminue le nombre de PA de 54 % ($4,88 \pm 0,94$ vs $2,66 \pm 0,92$, $n=4$, Figure 34A) par rapport à la situation contrôle. Par ailleurs on constate une augmentation du délai d'apparition du premier PA ($91,5 \pm 16,4$ ms vs $127,02 \pm 30,51$ ms, $n=4$, Figure 34A). Aucune modification de la résistance d'entrée ($130,96 \pm 12,57$ mΩ vs $127,61 \pm 13,74$ mΩ, Figure 34A), ni du potentiel de repos de la cellule ($-65,15 \pm 1,5$ mV vs $-62,33 \pm 2,34$ mV, $n=4$, Figure 34A), ni de l'amplitude des PA ($75,29 \pm 3,29$ mV vs $75,8 \pm 3,99$ mV, $n=4$, Figure 34A) n'a été relevée. Suite à cela, nous avons utilisé la même approche que précédemment, qui consiste à incuber les tranches pendant 45 min dans la *RgDAAO*. Dans ces conditions, la dopamine n'a plus aucun effet sur l'excitabilité des neurones pyramidaux du PFC (Figure 34B). En effet, l'application de dopamine ne modifie pas

le potentiel de repos de la cellule ($-63,62 \pm 1,93$ mV vs $63,42 \pm 1,96$ mV, Figure 34B), ni le délai d'apparition du premier PA ($196,25 \pm 30,56$ ms vs $188,75 \pm 27,74$ ms, Figure 34B), ni la résistance d'entrée ($146,3 \pm 16,17$ m Ω vs $146,2 \pm 16,28$ m Ω , Figure 34B), ni l'amplitude des PA ($70,02 \pm 2,59$ mV vs $67,47 \pm 1,18$ mV, Figure 34B). Ces résultats indiquent que la dopamine à forte concentration module l'excitabilité neuronale principalement voir uniquement via la D-sérine.

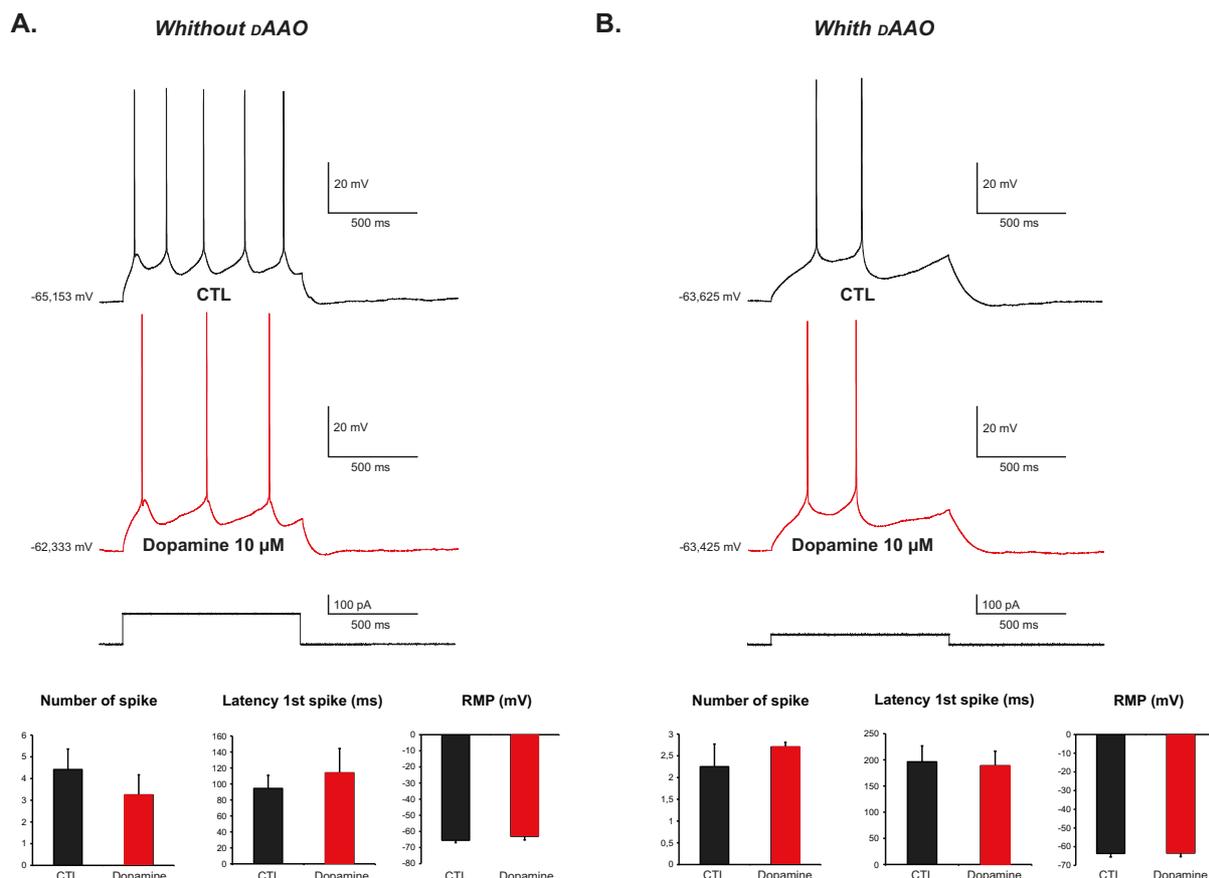


Figure 34 : La dopamine module l'excitabilité neuronale via la D-sérine. A. La dopamine à 10μ M diminue le nombre de potentiel d'action de plus de 50 % tout en augmentant le délai d'apparition du premier PA. B. En présence de *RgDAAO*, la dopamine n'a plus d'effet sur l'excitabilité neuronale.

Nous venons de démontrer que l'effet biphasique de la dopamine ne s'applique pas uniquement aux modulations de la transmission synaptique, puisque nous observons aussi un effet biphasique de la dopamine sur l'excitabilité neuronale. Ces modulations impliquent aussi la D-sérine. Les effets modulateurs de la dopamine sur l'excitabilité neuronale ont été démontrés par Ceci et ses collaborateurs (Ceci et al. 1999). Au cours de cette étude, les auteurs ont démontré que l'augmentation de

l'excitabilité neuronale est corrélée à l'augmentation de la concentration de dopamine (1-100 μM). Nos résultats sont différents puisque nous trouvons une modulation positive à faible concentration (1 μM) et négative à forte concentration (10 μM) de dopamine. Ces différences peuvent s'expliquer par la localisation des neurones pyramidaux enregistrés. En effet, Ceci et ses collaborateurs enregistrent les neurones pyramidaux des couches II/III alors que dans notre étude, nous enregistrons les neurones des couches V/VI. Or, les types de récepteurs de la dopamine rencontrés sont différents suivant les couches. Les neurones pyramidaux des couches II/III arborent principalement des récepteurs D4 (Ariano et al. 1997) alors que dans les couches V/VI on trouve principalement des récepteurs D1 et D2 (Vincent et al. 1995). L'implication des récepteurs D1 et D2 dans la modulation de l'excitabilité neuronale a été démontrée dans les couches V/VI. En effet, l'application de SKF38393, un agoniste des récepteurs D1 augmente l'excitabilité (Wang and O'Donnell 2001; Tseng and O'Donnell 2004). Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus pour la dopamine à une concentration de 1 μM . A contrario, l'application de quinpirole, agoniste des récepteurs de type D2, diminue l'excitabilité neuronale de façon similaire à ce que nous avons observé lors de l'application de dopamine à 10 μM . L'ensemble de ces résultats indique donc que les effets de la dopamine n'impliquent pas les mêmes récepteurs en fonction des couches du PFC considérées. Par ailleurs dans le cadre de notre étude, il serait intéressant de tester les effets des agonistes des récepteurs D1 et D2 ainsi que le rôle de la D-sérine sur notre préparation mais aussi sur les souris SR KO.

Nous nous sommes intéressés ici uniquement aux interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique. Toutefois, le GABA est impliqué dans la schizophrénie et les liens avec le récepteur NMDA sont évidents. En effet, l'invalidation de la sous unité NR1 localisée sur les interneurons GABAergiques chez la souris, provoque un phénotype comportemental rencontré chez les patients schizophrènes, comme l'anhédonie ou l'anxiété (Belforte et al. 2010). Ces altérations décrites par Belforte et ses collaborateurs s'expliquent par un déséquilibre de la balance inhibition/excitation (Figure 36). Les récepteurs NMDA localisés sur les interneurons sont activés par les neurones pyramidaux ce qui à pour conséquence une augmentation de l'inhibition et donc une diminution de l'excitation. Dans notre

étude, nous ne connaissons pas la contribution des interneurones. La dopamine à faible concentration module positivement la libération de D-sérine qui peut donc se fixer entre autre sur les récepteurs NMDA présents sur les interneurones. Dans ces conditions, les interneurones sont plus actifs et devraient réduire l'excitabilité des neurones pyramidaux que nous enregistrons. Or nous constatons une augmentation de l'excitabilité des neurones pyramidaux. Il est donc possible que la D-sérine ne soit pas le coagoniste endogène des récepteurs NMDA localisés sur les interneurones. L'autre possibilité, est que les interneurones ne soient que faiblement impliqués dans les interactions entre système dopaminergique et glutamatergique. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'appliquer de la dopamine à faible concentration en présence de picrotoxine, antagoniste des récepteurs GABAA, afin de mesurer dans ces conditions l'effet modulateur de la dopamine sur l'excitabilité des neurones pyramidaux du PFC.

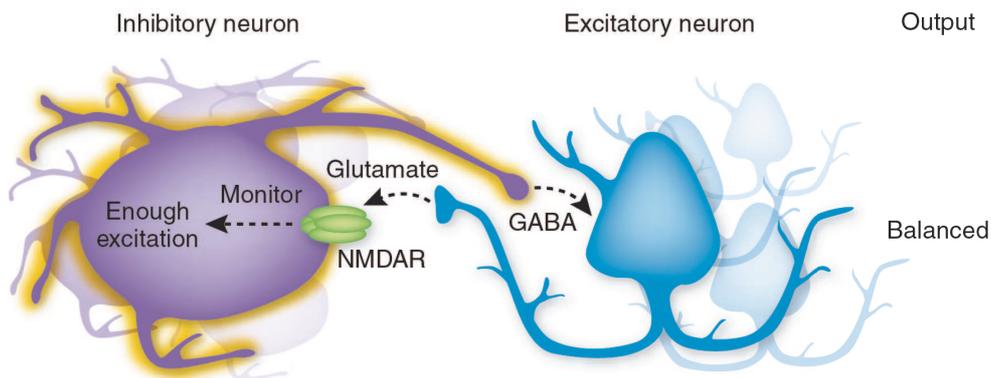


Figure 36 : Représentation de la balance excitation inhibition. Les interneurones sont activés par les neurones pyramidaux au travers du récepteur NMDA. Les interneurones sont donc plus actifs, ce qui entraîne à son tour une diminution de l'activité des neurones pyramidaux par l'intermédiaire du GABA (Gordon 2010).

En conclusion, nous avons très clairement démontré que la D-sérine est au cœur de la modulation de l'excitabilité des neurones pyramidaux du PFC, par la dopamine. Ces résultats indiquent donc que la D-sérine n'est pas uniquement impliquée dans la transmission synaptique. Par ailleurs, l'effet biphasique de la dopamine sur la modulation de l'excitabilité neuronale est valable tout comme pour la transmission synaptique. Ces résultats sont schématisés ci-dessous (Figure 37).

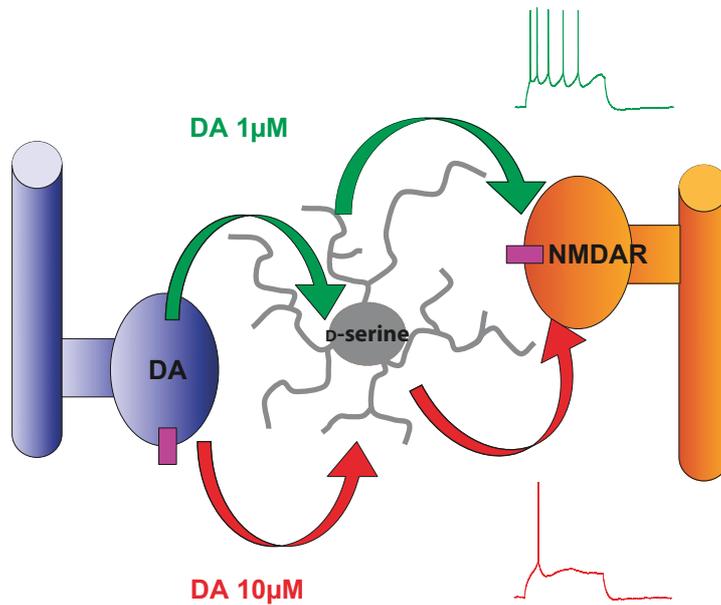


Figure 37 : Schématisation des effets de la dopamine sur l'excitabilité des neurones pyramidaux du PFC.

2.3. Modulation par la dopamine de la libération de D-sérine par les astrocytes.

Notre étude a permis de mettre en évidence que la dopamine est un puissant modulateur aussi bien de la transmission synaptique que de l'excitabilité des neurones pyramidaux des couches V/VI du PFC. Les récepteurs de la dopamine sont présents au niveau des neurones pyramidaux en présynaptique mais aussi en postsynaptique. D'autre part, nous avons mis en évidence que les effets modulateurs de la dopamine sont relayés par la D-sérine. Les effets modulateurs de la dopamine dans notre étude peuvent donc s'expliquer par une action directe de la dopamine sur les neurones. Toutefois, une série d'arguments conforte l'idée que les récepteurs de

la dopamine ne sont pas uniquement localisés sur les neurones mais aussi sur les astrocytes. En effet, la présence de récepteurs D2 a été démontrée notamment chez le singe (Khan et al. 2001). De plus, d'une part les astrocytes expriment les protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires activées par les récepteurs de la dopamine, comme DARPP-32 (Glausier et al. 2010). Enfin, l'application de dopamine sur des astrocytes en culture entraîne une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Parpura and Haydon 2000). Or l'augmentation de calcium est indispensable à la libération de D-sérine (Mothet et al. 2005) et nos immunomarquages ont permis de mettre en évidence que les astrocytes constituent la principale source de D-sérine dans le PFC (Fossat, Turpin et coll., soumis). Nous émettons donc l'hypothèse que les astrocytes agiraient comme relais dans les effets modulateurs par la dopamine des synapses glutamatergiques en évoquant et/ou modulant la libération de D-sérine astrocytaire.

Pour répondre à cette question, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la localisation dans le PFC de deux principaux récepteurs de la dopamine D1 et D2 ainsi qu'à la protéine DARPP-32. Pour cela, nous avons effectué un double immunomarquage de ces protéines versus un marqueur astrocytaire dans le PFC du rat adulte.

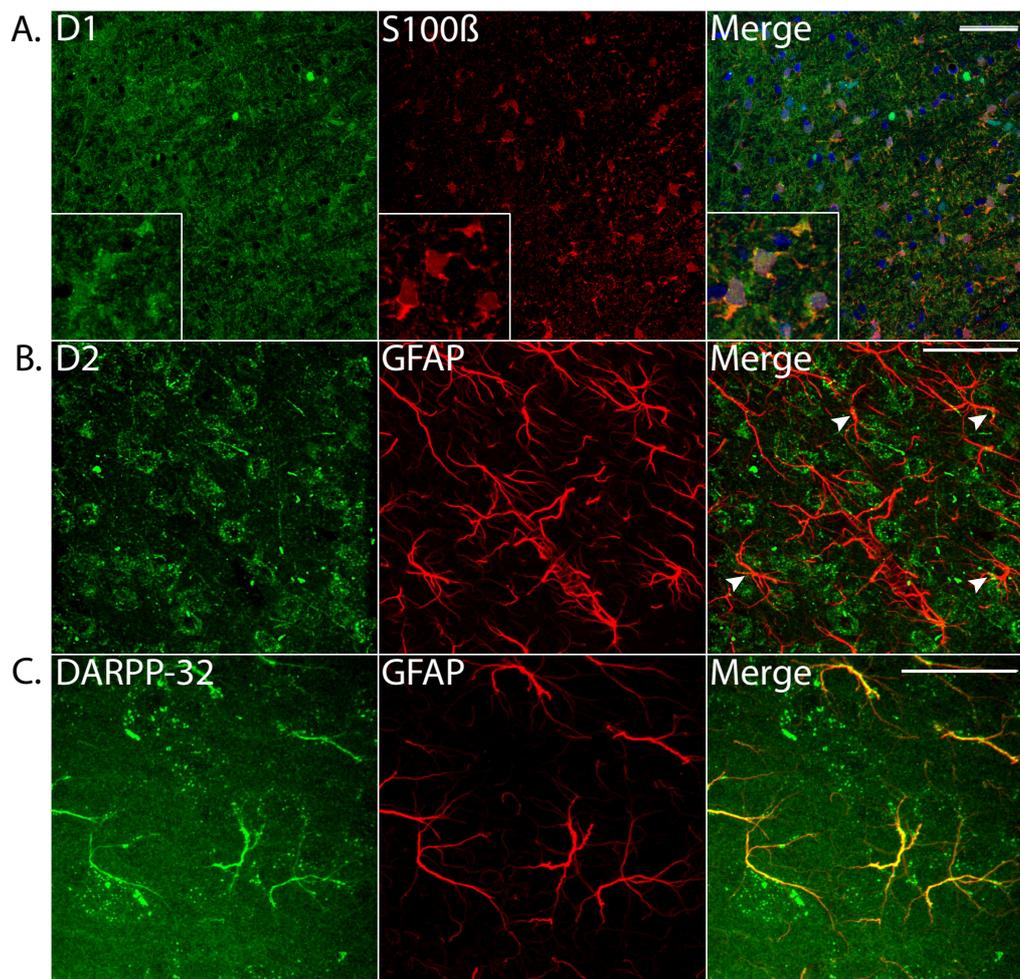


Figure 38 : Distribution cellulaire des récepteurs D1 et D2 et de la protéine DARPP-32 sur des tranches de PFC de rat adulte. A. Double immunomarquage des récepteurs D1 (1/1000e) vs S100β (1/2000e). B. Double immunomarquage des récepteurs D2 (1/1000e) vs GFAP (1/2000e), les flèches indiquent la colocalisation entre ces deux protéines. C. Double immunomarquage de la protéine DARPP-32 (1/1000e) vs GFAP (1/2000e). Echelle 25 μM.

L'immunomarquage des récepteurs D1 montre un marquage ponctiforme localisés dans différentes populations neuronales mais aussi au niveau des astrocytes (Figure 38A). La distribution des récepteurs D1 est ubiquitaire dans les couches V/VI du PFC. Toutefois, les récepteurs D1 sont principalement exprimés dans les neurones au niveau de leurs prolongements et faiblement au niveau du soma. La localisation au niveau des prolongements est cohérente avec leurs rôles de modulateur de la transmission synaptique. La protéine DARPP-32 est fortement exprimée dans les couches V/VI, elle est présente dans les astrocytes comme dans les neurones (Figure 38C). Les techniques d'immunomarquage mettent en évidence un faible niveau de colocalisation entre les récepteurs D2 et la GFAP, marqueur des

astrocytes, dans les couches V/VI du PFC de rat (Figure 38B). Afin d'étudier plus précisément la localisation des récepteurs D1 et D2 nous collaborons actuellement avec le Bordeaux Imaging Center (BIC) pour révéler la localisation cellulaire des récepteurs de la dopamine et de DARPP32 par les techniques d'immunoperoxydase en microscopie électronique. Cette approche nous permettra de déterminer avec certitude la localisation cellulaire de ces récepteurs. En effet, la résolution optimale en microscopie confocale (≈ 120 nm sur l'axe xy et ≈ 240 nm sur l'axe Z) ne nous permet pas de d'affirmer si le récepteur est localisé sur la membrane des astrocytes ou sur la membrane des neurones adjacents, ni de voir la fente synaptique. La microscopie électronique sur des coupes semi-fines par sa résolution beaucoup plus élevée (0,2 nm) va nous permettre de localiser très précisément les récepteurs D1 et D2 y compris dans les compartiments les plus restreints.

Afin de déterminer la contribution des astrocytes dans les modulations de la transmission glutamatergique par la dopamine. Nous avons incubé des tranches de cortex préfrontal dans du fluoroacétate pendant 45 min. Le fluoroacétate est préférentiellement capturé par les astrocytes qui vont le métaboliser. Le fluoroacétate va inhiber le cycle de krebs dans les astrocytes et donc les priver d'énergie sans toutefois les tuer. Il est important de noter que le fluoroacétate n'altère pas la probabilité de libération des neurotransmetteurs, ce qui indique que les neurones ne sont pas affectés (Voir figure 6, publication 1) Dans ces conditions, l'application de dopamine à $1 \mu\text{M}$ potentialise les EPSCs NMDA de $17,36 \pm 2,59$ % ($n=6$, $p<0,05$, Figure 39A). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de l'application de dopamine à $1 \mu\text{M}$ suite à l'occlusion du site glycine du récepteur NMDA (Figure 39C). A contrario, l'application de dopamine à $10 \mu\text{M}$ diminue les EPSCs NMDA de $-23,33 \pm 4,35$ % ($n=8$, $p<0,01$, Figure 39B), ces résultats sont identiques à ceux obtenus lors de l'occlusion du site glycine du récepteur NMDA (Figure 39D).

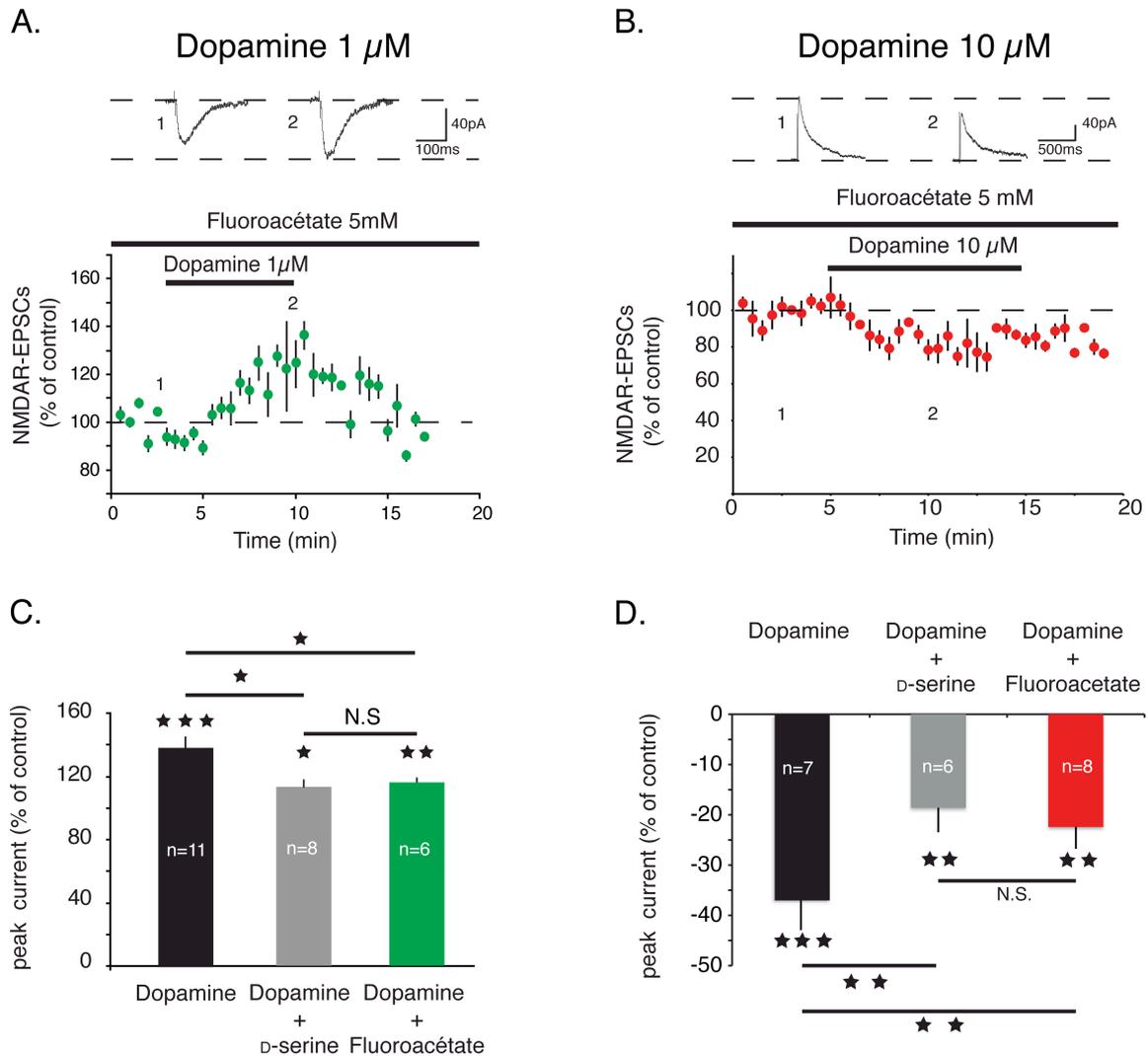


Figure 39 : Modulation des EPSCs NMDA par la dopamine, lorsque les astrocytes sont inhibés par le fluoroacétate. A. L'application de dopamine à 1 μ M potentialise les EPSCs NMDA ($17,36 \pm 2,59$ %, $n=6$, $p<0,01$). B. La dopamine à 10 μ M diminue les EPSCs NMDA ($-23,33 \pm 4,35$ %, $n=8$, $p<0,01$). C. Histogramme illustrant les effets de la dopamine à 1 μ M seule ou en présence de D-sérine saturante (100 μ M) ou en présence de fluoroacétate (5 mM). D. Histogramme illustrant les effets de la dopamine à 10 μ M seule ou en présence de D-sérine saturante (100 μ M) ou en présence de fluoroacétate (5 mM).

Les résultats obtenus pour la dopamine à 1 μ M ou à 10 μ M en présence de fluoroacétate sont identiques à ceux obtenus en présence de D-sérine saturante. L'ensemble de ces résultats indiquent que la dopamine module la transmission synaptique des neurones pyramidaux du PFC via la D-sérine astrocytaire.

Toutefois, la présence de récepteurs de la dopamine sur les astrocytes et le rôle des astrocytes dans la modulation de la transmission synaptique ne nous indiquent

en rien leurs fonctions. Sont-ils capables de moduler la libération de D-sérine? Afin d'élucider le rôle des récepteurs de la dopamine sur les astrocytes, nous avons mis en place le modèle de culture primaire d'astrocytes. Ce modèle nous a permis d'évaluer le rôle modulateur de la dopamine sur la libération de D-sérine.

Pour valider ce modèle nous avons tout d'abord déterminé la présence des récepteurs de la dopamine sur ces cultures d'astrocytes. Dans un premier temps, nous avons détecté la présence des ARNm par RT-PCR (Figure 40). Les astrocytes en culture expriment aussi bien les ARNm des récepteurs de type D1 que de type D2.

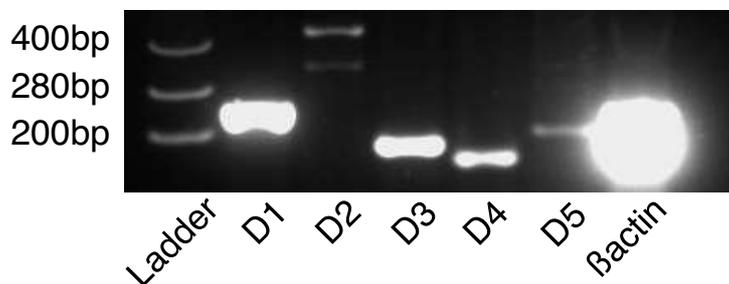


Figure 40 : ARNm des différents récepteurs de la dopamine. Les ARNm des cinq types de récepteurs de la dopamine sont présents dans les cultures primaires d'astrocytes corticaux.

Afin de confirmer la présence de ces récepteurs au niveau protéique, nous avons réalisé des expériences de double immunomarquages. Grâce à cette technique nous avons pu confirmer que l'ensemble des récepteurs de la dopamine sont exprimés par les astrocytes en culture. Ces résultats nous permettent de valider notre modèle de culture primaire d'astrocytes corticaux.

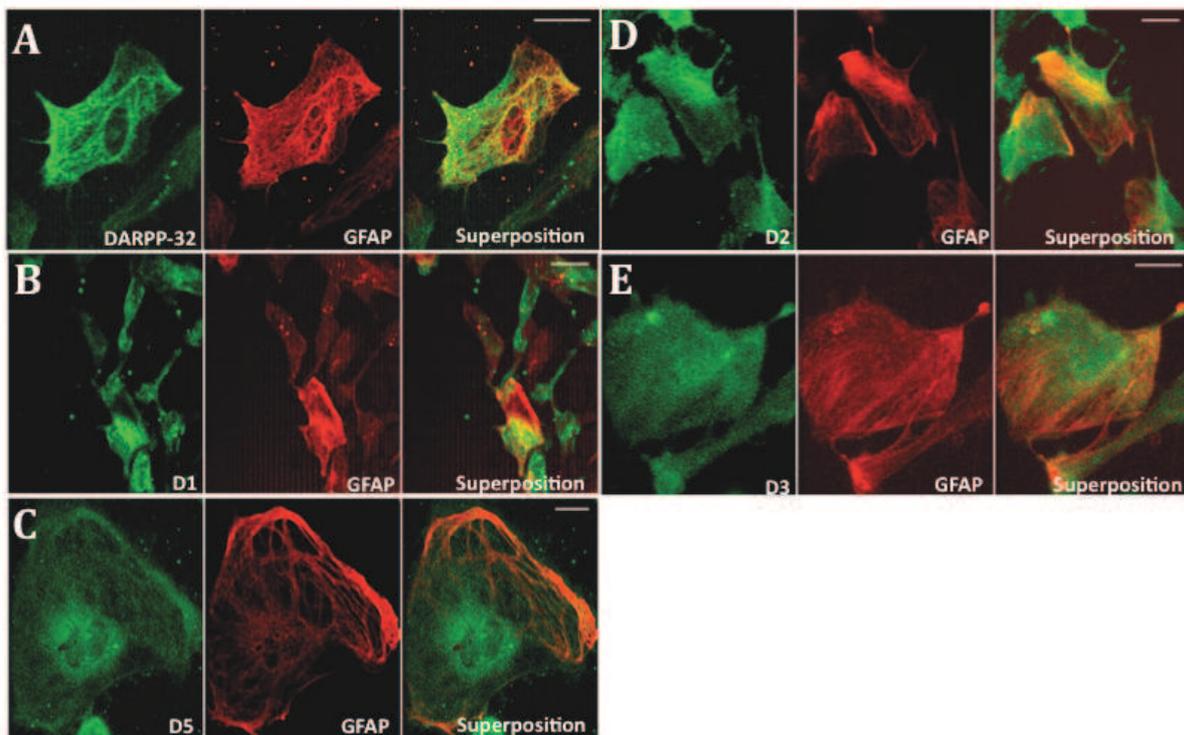


Figure 41 : Immunomarquage de DARPP-32 et des récepteurs D1-like et D2-Like sur astrocytes corticaux en culture. A: Anticorps anti-DARPP-32 + Anticorps anti-GFAP; B: Anticorps anti-D1 + Anticorps anti-GFAP; C: Anticorps anti-D5 + Anticorps anti-GFAP; D: Anticorps anti-D2 + Anticorps anti-GFAP ; E: Anticorps anti-D3 + Anticorps anti-GFAP. Echelle: 25 μ m.

Nous avons démontré que les récepteurs de la dopamine sont présents sur les astrocytes. Ont-ils la capacité, de moduler la libération de D-sérine? Pour répondre à cette question, nous avons appliqué de la dopamine et des agonistes des différents récepteurs de la dopamine sur des cultures primaires d'astrocytes. Nous avons quantifié la libération de D-sérine, L-sérine, glycine et glutamate par électrophorèse capillaire. L'application de tACPD, un agoniste des récepteurs métabotropiques du groupe I et II au glutamate, ou de quinpirole un agoniste D2 n'a aucun effet sur la libération de l'ensemble de ces acides aminés (Figure 42A-D). A contrario, l'application de dopamine (1 μ M), de SKF81297, de SKF81297 + tACPD et de quinpirole + tACPD entraîne une diminution de 30% ($p < 0,05$) des niveaux de D-sérine (Figure 42B). On constate que ces modulations sont spécifiques de la D-sérine. En effet, la libération de L-sérine, glycine ou glutamate n'est pas affectée par l'activation des récepteurs de la dopamine (Figure 42A, C, D).

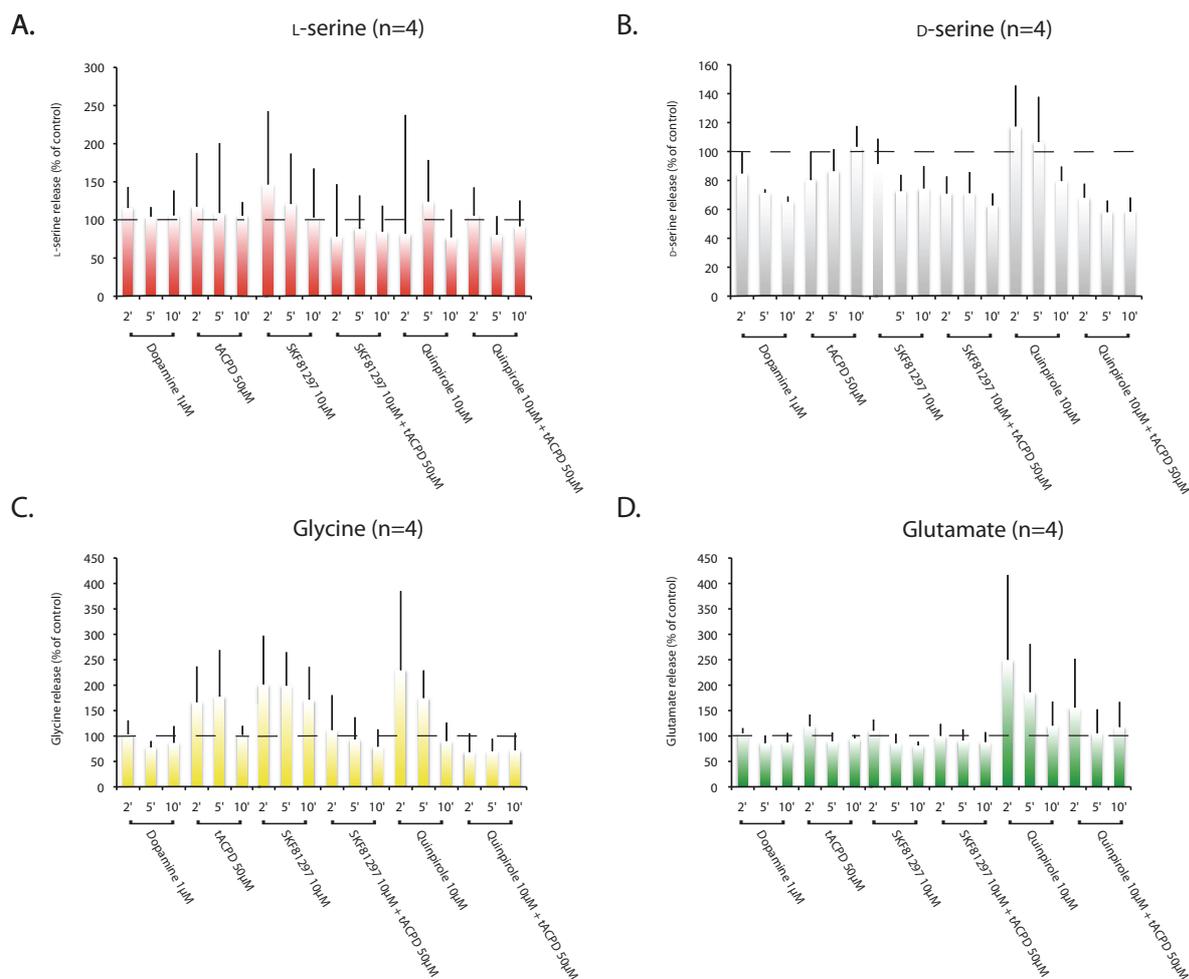


Figure 42 : Mesure de la libération de différents acides aminés en réponse à l'activation des récepteurs de la dopamine. A, C et D L'application d'agoniste des récepteurs de la dopamine ne modifie pas la libération ni de L-sérine, ni de glycine, ni de glutamate. B. La libération de D-sérine est modulée par l'activation des récepteurs de la dopamine.

La concentration des agonistes doit être diminuée car ces résultats ne sont pas en accord avec ceux que nous avons démontré en électrophysiologie. Nous nous attendions à avoir une augmentation des taux exogènes de D-sérine, lorsque nous appliquions de la dopamine à $1\mu\text{M}$ ou du SKF81297. Or nous constatons une diminution. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la dopamine comme le SKF81297, à faible concentration agissent sur les récepteurs D1. Néanmoins à forte concentration, ces deux molécules agissent aussi sur les récepteurs D2. Or, les astrocytes en culture forment une monocouche cellulaire, l'accessibilité des drogues aux récepteurs est donc facilitée par rapport aux tranches qui ont une épaisseur de $300\mu\text{M}$.

Par ailleurs, les astrocytes possèdent un certain nombre de protéines impliquées dans la recapture ainsi que dans la dégradation de la dopamine. En effet, la présence de DAT (Karakaya et al. 2007), le transporteur à la dopamine, COMT (Tchivileva et al. 2009) ou MAO (Vaarmann et al. 2010) deux enzymes impliquées dans la dégradation de la dopamine a été démontrée. Vaarmann et ses collaborateurs ont démontré au cours de leur étude que la dégradation de la dopamine par la MAO entraîne une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Or, la libération de D-sérine est dépendante de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Nous ne pouvons donc pas affirmer qu'une augmentation de la libération de D-sérine est uniquement due à l'activation des récepteurs D1. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions appliquer de la dopamine en présence d'antagoniste des récepteurs de la dopamine. Si, en présence de d'antagoniste nous constatons une augmentation des niveaux de D-sérine, nous pourrions déduire que cette augmentation est due à la dégradation de la dopamine. Dans le cas contraire, si nous ne constatons aucune modification des niveaux de D-sérine, nous démontrerions clairement que l'activation des récepteurs de la dopamine est indispensable pour la modulation de la libération de D-sérine.

D'autre part, les astrocytes ayant la capacité de recapter la dopamine, il est plausible qu'ils puissent aussi la libérer et moduler ainsi la transmission synaptique ou l'excitabilité des neurones pyramidaux. Toutefois, la présence de VMAT, le transporteur vésiculaire notamment de la dopamine, n'a pas à l'heure actuelle été démontrée dans les astrocytes.

En conclusion, nous avons démontré que la dopamine module la transmission synaptique via la D-sérine astrocytaire. Par ailleurs, nous avons détecté la présence de récepteurs D1 et de DARPP-32 et de façon moins certaine la présence de D2 dans les astrocytes. Finalement, nous avons mesuré une modulation de la libération de D-sérine astrocytaire en réponse à l'activation des récepteurs de la dopamine. Nous venons donc de démontrer le rôle central des astrocytes et de la D-sérine dans la modulation du système glutamatergique par le système dopaminergique.

Conclusions et perspectives.

Conclusions et perspectives.

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique caractérisée par une triade de symptômes : positifs, négatifs et cognitifs. L'étiologie de cette pathologie est encore mal connue. Néanmoins, des facteurs environnementaux et génétiques sont impliqués. Plusieurs structures cérébrales comme, le cortex préfrontal ou l'hippocampe et plus généralement le système limbique présentent des altérations chez les patients schizophrènes. Le cortex préfrontal est le siège des fonctions cognitives comme le langage, la mémoire de travail ou le raisonnement et est donc particulièrement impliqué dans la schizophrénie. Un certain nombre d'hypothèses pouvant expliquer les mécanismes cellulaires est proposé. Historiquement, l'hypothèse dopaminergique est la plus connue et repose sur les premiers traitements utilisés, comme les neuroleptiques qui se sont révélés être des antagonistes d'un sous type de récepteur de la dopamine, les récepteurs D2. Ces neuroleptiques sont principalement efficaces sur les symptômes positifs. La découverte du mode d'action de certaines drogues d'abus comme la phencyclidine, qui bloque l'activité du récepteur NMDA et mime chez les patients sains des symptômes de type schizophrène, a conduit à l'émergence d'une seconde hypothèse : l'hypothèse glutamatergique. De nombreuses études ont permis d'étayer cette dernière hypothèse. En effet, des liens génétiques ont mis en évidence le rôle central du récepteur NMDA et plus particulièrement de son co-agoniste la D-sérine. Les taux de D-sérine sont diminués chez les patients schizophrènes, ce qui peut en partie s'expliquer par une augmentation de l'activité de son enzyme de dégradation la DAAO et une réduction de sa synthèse du fait d'une altération de l'expression de la sérine racémase chez les patients. L'adjonction de D-sérine en complément des neuroleptiques permet d'améliorer les symptômes négatifs et cognitifs jusqu'ici résistants aux approches thérapeutiques. L'hypothèse glutamatergique a comme «acteur principal» l'hypofonction du récepteur NMDA. Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé aux interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique. Le but étant de proposer un mécanisme cellulaire permettant de faire le lien entre ces deux systèmes dans l'optique de poser les bases d'un modèle

de fonctionnement de la circuitrie cérébrale et donc de son dysfonctionnement dans la schizophrénie. Nous avons émis l'hypothèse que la D-sérine et son métabolisme pourrait constituer des éléments clés dans le fonctionnement de la circuiterie cérébrale et avoir un rôle central dans ces interactions.

Dans la première partie de ma thèse, nous nous sommes attachés à déterminer le rôle de la D-sérine dans le contrôle de l'activité des récepteurs NMDA au niveau des synapses excitatrices glutamatergiques des couches V/VI du PFC, rôle qui est à ce jour inconnu. Nous avons pu mettre en évidence que la D-sérine et non la glycine est le co-agoniste endogène des récepteurs NMDA synaptiques comme cela a été démontré dans d'autres structures comme l'hippocampe, l'hypothalamus ou la rétine. De plus, nous avons démontré que la D-sérine est indispensable à l'induction d'une potentialisation à long terme NMDA dépendante dans les couches V/VI du PFC. Finalement, nous pu mettre en évidence que la D-sérine dans le PFC est synthétisée uniquement par les astrocytes alors qu'elle peut être dégradée par les astrocytes comme par les neurones.

Dans un deuxième temps, nous avons pu mettre en évidence le rôle de la D-sérine dans les interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique. En effet, nous avons clairement établi que la modulation biphasique de la transmission synaptique et de l'excitabilité neuronale de la dopamine (positive à faible concentration et négative à forte concentration) implique directement la D-sérine. La D-sérine est la clef de voute des ces interactions. En effet, la dégradation spécifique de la D-sérine par une enzyme, la *RgDAAO* réduit significativement voire bloque les effets modulateurs de la dopamine sur la transmission synaptique glutamatergique et l'excitabilité neuronale des neurones pyramidaux du PFC.

Au cours de la dernière partie de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles des astrocytes dans le dialogue entre systèmes dopaminergique et glutamatergique. Pour ce faire nous avons démontré dans un premier temps que les astrocytes sont l'unique source de D-sérine dans le PFC. Deuxièmement, l'inhibition des astrocytes par le fluoroacétate, un inhibiteur métabolique des astrocytes a permis de révéler que les astrocytes et la D-sérine sont indispensables dans les modulations du système glutamatergique par la dopamine. Troisièmement, nous avons démontré la présence de récepteurs D1 et D2 et d'une protéine clé de la

voie intracellulaire des récepteurs de la dopamine, DARPP-32 sur les astrocytes. Finalement, nous avons démontré que la dopamine module directement la libération de D-sérine par les astrocytes.

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un nouveau modèle pour les interactions entre dopamine et glutamate dans la circuiterie cérébrale. Jusqu'à présent tous les modèles reposaient sur une vision neurocentrique de l'activité de la microcircuiterie cérébrale et des interactions entre systèmes de neurotransmission. Notre étude conclut sur le rôle essentiel de la D-sérine d'origine gliale dans la dynamique entre systèmes dopaminergique et glutamatergique. Nous proposons ici que ce type d'interaction renforce le concept de synapse tripartite proposé par Araque et ses collègues (Araque et al. 1999). Par ailleurs, notre modèle met en avant le rôle majeur que pourrait jouer les astrocytes dans la schizophrénie où ils sont à l'heure actuelle, totalement ignorés. Finalement, ce modèle valide les approches cliniques actuellement développées notamment au travers de l'adjonction de D-sérine de D-sérine en complément des neuroleptiques.

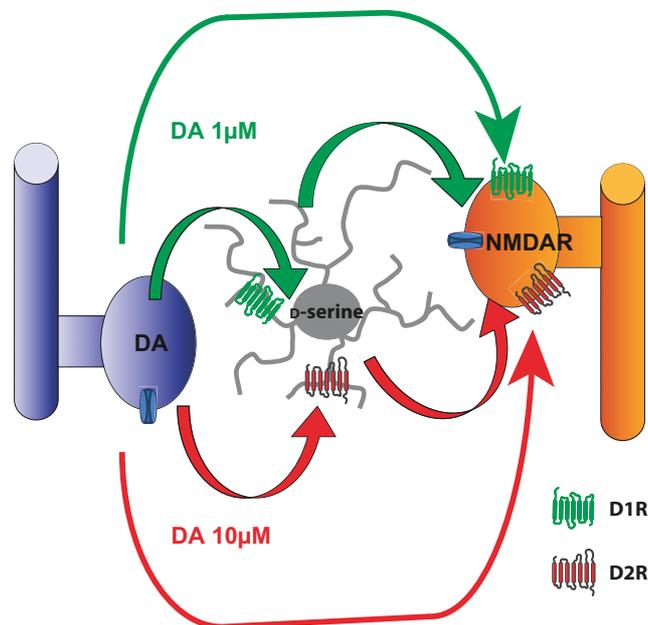


Figure : Représentation des effets modulateurs de la dopamine sur la transmission synaptique et l'excitabilité des neurones pyramidaux qui agissent de façon directe et indirecte. La dopamine module directement la transmission synaptique et l'excitabilité neuronale par l'intermédiaire des récepteurs de la dopamine, présents sur les neurones pyramidaux postsynaptique. La transmission synaptique et l'excitabilité neuronale sont modulées indirectement par l'intermédiaire d'une modulation de la libération de D-sérine astrocytaire. La libération de D-sérine est donc modulée par les récepteurs de la dopamine, présents à la surface des astrocytes qui intègrent le signal dopaminergique. D1R : récepteur D1 ; D2R : récepteur D2.

Le modèle que nous venons de présenter est basé sur des expériences réalisées sur des préparations *ex vivo* de PFC. Il serait intéressant de déterminer si notre modèle intégrant la glie dans le dialogue entre système dopaminergique et glutamatergique peut s'appliquer aussi *in vivo*. Dans cette perspective, il sera possible d'appliquer les techniques d'enregistrements extracellulaires de potentiels de champs dans le PFC chez l'animal anesthésié. Nous souhaiterions évaluer la contribution des astrocytes et plus spécifiquement de la D-sérine à l'aide de la pharmacologie décrite dans ce travail de thèse, mais également par des approches d'inactivation conditionnelle et temporelle de l'expression de gènes comme la sérine racémase ou la D-amino acide oxydase spécifiquement dans les astrocytes. Grâce à une collaboration établie avec le groupe de Joseph T Coyle (Department of Psychiatry, Harvard Medical School), il nous sera possible de valider notre modèle en phénotypant des souris mutantes présentant une inactivation de la SR. Ces souris présentent des déficits cognitifs similaires à ceux rencontrés chez les patients schizophrènes (Devito et al., 2010). Si notre modèle est exact, les effets modulateurs de la dopamine sur la transmission synaptique et l'excitabilité des neurones pyramidaux devraient être fortement affectés voire absents. Il est aussi envisageable de mesurer par microdialyse intracérébrale ou par ampérométrie grâce à la biosonde développée dans l'équipe (Pernot et al., 2008), les niveaux de D-sérine après une injection locale de dopamine, de ses agonistes ou antagonistes et notamment des neuroleptiques ayant prouvé leur efficacité thérapeutique. Par ailleurs, de nombreux modèles animaux de la schizophrénie (Bubenikova-Valesova et al. 2008) ciblent les récepteurs NMDA, comme les PCP ou MK801. Nous pourrions évaluer dans ces modèles les effets de la dopamine sur la transmission glutamatergique et sur les niveaux de D-sérine. Inversement, il est fort probable que ces modulations soient également réciproques. Les neurones dopaminergiques arborent des récepteurs NMDA. Quel est l'effet d'une ablation pharmacologique ou génique de la D-sérine sur l'activité des neurones dopaminergiques ?

D'autre part, Belforte et ses collaborateurs (Belforte et al. 2010) ont démontré que les animaux présentant une ablation spécifique de l'expression des récepteurs NMDA sur les interneurones GABAergiques du PFC développent des symptômes type schizophrène. Ces animaux présentent des déficits de mémoire sociale et

spatiale, d'hyperlocomotion et une anhédonie. La présence de récepteurs NMDA sur les interneurons GABAergiques du PFC nous amène à nous interroger sur les mécanismes cellulaires modulateurs de ces récepteurs et sur la nature donc du co-agoniste responsable de leur activation. Si la D-sérine est le co-agoniste de ces récepteurs, nous obtiendrions un modèle étendu du modèle que nous proposons dans lequel cet acide aminé et son métabolisme orchestraient une triade d'interactions entre dopaminergique, glutamatergique et GABAergique. Il sera donc intéressant de déterminer la fonction de la D-sérine. Ce super complexe neurochimique, s'il a lieu, avec au centre la D-sérine permettrait de rendre compte de l'ensemble des altérations moléculaires rencontrées chez les patients schizophrènes.

Les interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique ne sont pas limitées au PFC. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer le rôle de la D-sérine dans ces modulations dans l'hippocampe ou le striatum, deux structures impliquées dans la schizophrénie. Finalement, les interactions entre systèmes dopaminergique et glutamatergique sont impliquées dans d'autres pathologies comme la maladie de Parkinson. Dans la maladie de Parkinson les interactions entre ces deux systèmes sont importantes au niveau du striatum et du thalamus. Il pourrait donc être intéressant de déterminer dans ces deux structures le rôle de la D-sérine. Si des modulations de même type que celles présentées au cours de cette thèse ont lieu dans ces structures, nous pourrions démontrer le côté ubiquitaire de notre modèle qui pourrait trouver un écho pour d'autres synaptopathies où une dérégulation entre systèmes glutamatergique et dopaminergique est observée.

Bibliographie

Bibliographie

A.

- Abi-Dargham, A., O. Mawlawi, et al. (2002). "Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia." *J Neurosci* **22**(9): 3708-19.
- Adler, C. M., A. K. Malhotra, et al. (1999). "Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia." *Am J Psychiatry* **156**(10): 1646-9.
- Alt, A., E. S. Nisenbaum, et al. (2006). "A role for AMPA receptors in mood disorders." *Biochem Pharmacol* **71**(9): 1273-88.
- Ampe, B., A. Massie, et al. (2007). "NMDA-mediated release of glutamate and GABA in the subthalamic nucleus is mediated by dopamine: an in vivo microdialysis study in rats." *J Neurochem* **103**(3): 1063-74.
- Angrist, B. M. and S. Gershon (1970). "The phenomenology of experimentally induced amphetamine psychosis--preliminary observations." *Biol Psychiatry* **2**(2): 95-107.
- Angulo, M. C., A. S. Kozlov, et al. (2004). "Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus." *J Neurosci* **24**(31): 6920-7.
- Araque, A., V. Parpura, et al. (1998). "Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons." *Eur J Neurosci* **10**(6): 2129-42.
- Araque, A., V. Parpura, et al. (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." *Trends Neurosci* **22**(5): 208-15.
- Araque, A., R. P. Sanzgiri, et al. (1998). "Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci* **18**(17): 6822-9.
- Ariano, M. A., J. Wang, et al. (1997). "Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera." *Brain Res* **752**(1-2): 26-34.

B.

- Barres, B. A. (1991). "Glial ion channels." *Curr Opin Neurobiol* **1**(3): 354-9.
- Baumgart, F. and I. Rodriguez-Crespo (2008). "D-amino acids in the brain: the biochemistry of brain serine racemase." *FEBS J* **275**(14): 3538-45.
- Belforte, J. E., V. Zsiros, et al. (2010). "Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes." *Nat Neurosci* **13**(1): 76-83.
- Bell, D. S. (1973). "The experimental reproduction of amphetamine psychosis." *Arch Gen Psychiatry* **29**(1): 35-40.
- Bendikov, I., C. Nadri, et al. (2007). "A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia." *Schizophr Res* **90**(1-3): 41-51.

- Benke, T. A., A. Luthi, et al. (1998). "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." *Nature* **393**(6687): 793-7.
- Benson, M. A., S. E. Newey, et al. (2001). "Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain." *J Biol Chem* **276**(26): 24232-41.
- Bergeron, R., J. T. Coyle, et al. (2005). "NAAG reduces NMDA receptor current in CA1 hippocampal pyramidal neurons of acute slices and dissociated neurons." *Neuropsychopharmacology* **30**(1): 7-16.
- Bergeron, R., T. M. Meyer, et al. (1998). "Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15730-4.
- Bergles, D. E., J. S. Diamond, et al. (1999). "Clearance of glutamate inside the synapse and beyond." *Curr Opin Neurobiol* **9**(3): 293-8.
- Bhugra, D. (2005). "The global prevalence of schizophrenia." *PLoS Med* **2**(5): e151; quiz e175.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol* **232**(2): 331-56.
- Boileau, I., A. Dagher, et al. (2006). "Modeling sensitization to stimulants in humans: an [11C] raclopride/positron emission tomography study in healthy men." *Arch Gen Psychiatry* **63**(12): 1386-95.
- Brown, A. S. (2006). "Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia." *Schizophr Bull* **32**(2): 200-2.
- Brundege, J. M. and T. V. Dunwiddie (1997). "Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system." *Adv Pharmacol* **39**: 353-91.

C.

- Burt, D. R., I. Creese, et al. (1977). "Antischizophrenic drugs: chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain." *Science* **196**(4287): 326-8.
- Callier, S., M. Snapyan, et al. (2003). "Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates." *Biol Cell* **95**(7): 489-502.
- Cardno, A. G., E. J. Marshall, et al. (1999). "Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series." *Arch Gen Psychiatry* **56**(2): 162-8.
- Carlsson, A. (1959). "The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system." *Pharmacol Rev* **11**(2, Part 2): 490-3.
- Ceci, A., A. Brambilla, et al. (1999). "Effect of antipsychotic drugs and selective dopaminergic antagonists on dopamine-induced facilitatory activity in prelimbic cortical pyramidal neurons. An in vitro study." *Neuroscience* **93**(1): 107-15.
- Cepeda, C. and M. S. Levine (2006). "Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap." *Sci STKE* **2006**(333): pe20.
- Chatterton, J. E., M. Awobuluyi, et al. (2002). "Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits." *Nature* **415**(6873): 793-8.
- Chen, G., P. Greengard, et al. (2004). "Potentiation of NMDA receptor currents by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2596-600.

- Chen, X. W., Y. Q. Feng, et al. (2008). "DTNBP1, a schizophrenia susceptibility gene, affects kinetics of transmitter release." *J Cell Biol* **181**(5): 791-801.
- Chumakov, I., M. Blumenfeld, et al. (2002). "Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13675-80.
- Civelli, O., J. R. Bunzow, et al. (1993). "Molecular diversity of the dopamine receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**: 281-307.
- Collingridge, G. L., S. J. Kehl, et al. (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." *J Physiol* **334**: 33-46.
- Collingridge, G. L., S. Peineau, et al. (2010). "Long-term depression in the CNS." *Nat Rev Neurosci* **11**(7): 459-73.
- Cook, S. P., I. Galve-Roperh, et al. (2002). "Direct calcium binding results in activation of brain serine racemase." *J Biol Chem* **277**(31): 27782-92.
- Corlew, R., Y. Wang, et al. (2007). "Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression." *J Neurosci* **27**(37): 9835-45.
- Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, et al. (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." *Science* **247**(4941): 470-3.
- Corrigan, J. J. and N. G. Srinivasan (1966). "The occurrence of certain D-amino acids in insects." *Biochemistry* **5**(4): 1185-90.

D.

- D'Aniello, A. and A. Giuditta (1978). "Presence of D-aspartate in squid axoplasm and in other regions of the cephalopod nervous system." *J Neurochem* **31**(4): 1107-8.
- De Miranda, J., R. Panizzutti, et al. (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**(22): 14542-7.
- Del Arco, A. and F. Mora (2009). "Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system interactions: implications for plasticity and psychiatric disorders." *J Neural Transm* **116**(8): 941-52.
- Del Arco, A., G. Segovia, et al. (2008). "Blockade of NMDA receptors in the prefrontal cortex increases dopamine and acetylcholine release in the nucleus accumbens and motor activity." *Psychopharmacology (Berl)* **201**(3): 325-38.
- Delay, J., P. Deniker, et al. (1952). "[N-dimethylamino-propylchlorophenothiazine (4560 RP) therapy of confusional states.]" *Ann Med Psychol (Paris)* **110**(2-3): 398-403.
- Detera-Wadleigh, S. D. and F. J. McMahon (2006). "G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis." *Biol Psychiatry* **60**(2): 106-14.
- Dickman, D. K. and G. W. Davis (2009). "The schizophrenia susceptibility gene dysbindin controls synaptic homeostasis." *Science* **326**(5956): 1127-30.

- Ding, X., N. Ma, et al. (2010). "Localization of D: -serine and serine racemase in neurons and neuroglia in mouse brain." Neurol Sci.
- Dingledine, R., K. Borges, et al. (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev **51**(1): 7-61.
- Dolan, R. J., P. Fletcher, et al. (1995). "Dopaminergic modulation of impaired cognitive activation in the anterior cingulate cortex in schizophrenia." Nature **378**(6553): 180-2.
- Duguid, I. C. and T. G. Smart (2004). "Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses." Nat Neurosci **7**(5): 525-33.
- Dunah, A. W., A. C. Sirianni, et al. (2004). "Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32." Mol Pharmacol **65**(1): 121-9.
- Dunah, A. W. and D. G. Standaert (2001). "Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane." J Neurosci **21**(15): 5546-58.
- Dunlop, D. S. and A. Neidle (1997). "The origin and turnover of D-serine in brain." Biochem Biophys Res Commun **235**(1): 26-30.
- Dunlop, D. S. and A. Neidle (2005). "Regulation of serine racemase activity by amino acids." Brain Res Mol Brain Res **133**(2): 208-14.
- Dunlop, D. S., A. Neidle, et al. (1986). "The presence of free D-aspartic acid in rodents and man." Biochem Biophys Res Commun **141**(1): 27-32.

F.

- Farber, K. and H. Kettenmann (2005). "Physiology of microglial cells." Brain Res Brain Res Rev **48**(2): 133-43.
- Fellin, T., O. Pascual, et al. (2004). "Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors." Neuron **43**(5): 729-43.
- Ferguson, S. S. (2003). "Receptor tyrosine kinase transactivation: fine-tuning synaptic transmission." Trends Neurosci **26**(3): 119-22.
- Fiacco, T. A. and K. D. McCarthy (2004). "Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons." J Neurosci **24**(3): 722-32.
- Fiorentini, C., C. Busi, et al. (2008). "Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization." Mol Pharmacol **74**(1): 59-69.
- Foltyn, V. N., I. Bendikov, et al. (2005). "Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an alpha,beta-elimination activity." J Biol Chem **280**(3): 1754-63.
- Forsythe, I. D., G. L. Westbrook, et al. (1988). "Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons." J Neurosci **8**(10): 3733-41.

Fujii, K., K. Maeda, et al. (2006). "Serine racemase binds to PICK1: potential relevance to schizophrenia." *Mol Psychiatry* **11**(2): 150-7.

Fuster, J. M. (2008). *The Prefrontal Cortex: Fourth Edition*. Los Angeles, Elsevier.

G.

Garcia, R. A., K. Vasudevan, et al. (2000). "The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3596-601.

Gessa, G. L., P. Devoto, et al. (2000). "Dissociation of haloperidol, clozapine, and olanzapine effects on electrical activity of mesocortical dopamine neurons and dopamine release in the prefrontal cortex." *Neuropsychopharmacology* **22**(6): 642-9.

Ghashghaei, H. T., J. Weber, et al. (2006). "The role of neuregulin-ErbB4 interactions on the proliferation and organization of cells in the subventricular zone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1930-5.

Giedd, J. N., J. Blumenthal, et al. (1999). "Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study." *Nat Neurosci* **2**(10): 861-3.

Giedd, J. N., N. O. Jeffries, et al. (1999). "Childhood-onset schizophrenia: progressive brain changes during adolescence." *Biol Psychiatry* **46**(7): 892-8.

Girault, J. A. and P. Greengard (2004). "The neurobiology of dopamine signaling." *Arch Neurol* **61**(5): 641-4.

Glausier, J. R., M. Maddox, et al. "Localization of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 and inhibitor-1 in area 9 of Macaca mulatta prefrontal cortex." *Neuroscience* **167**(2): 428-38.

Goff, D. C., G. Tsai, et al. (1995). "Dose-finding trial of D-cycloserine added to neuroleptics for negative symptoms in schizophrenia." *Am J Psychiatry* **152**(8): 1213-5.

Goghari, V. M., S. R. Sponheim, et al. (2010). "The functional neuroanatomy of symptom dimensions in schizophrenia: a qualitative and quantitative review of a persistent question." *Neurosci Biobehav Rev* **34**(3): 468-86.

Goldman-Rakic, P. S., E. C. Muly, 3rd, et al. (2000). "D(1) receptors in prefrontal cells and circuits." *Brain Res Brain Res Rev* **31**(2-3): 295-301.

Gordon, G. R., D. V. Baimoukhametova, et al. (2005). "Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy." *Nat Neurosci* **8**(8): 1078-86.

Gordon, J. A. (2010). "Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia." *Nat Neurosci* **13**(1): 2-4.

Gustafsson, B., H. Wigstrom, et al. (1987). "Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials." *J Neurosci* **7**(3): 774-80.

H.

- Hahn, C. G., H. Y. Wang, et al. (2006). "Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia." *Nat Med* **12**(7): 824-8.
- Hamase, K., R. Konno, et al. (2005). "Sensitive determination of D-amino acids in mammals and the effect of D-amino-acid oxidase activity on their amounts." *Biol Pharm Bull* **28**(9): 1578-84.
- Hardingham, G. E., Y. Fukunaga, et al. (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." *Nat Neurosci* **5**(5): 405-14.
- Harris, A. Z. and D. L. Pettit (2007). "Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices." *J Physiol* **584**(Pt 2): 509-19.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, et al. (1992). "The presence of free D-serine in rat brain." *FEBS Lett* **296**(1): 33-6.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, et al. (1992). "Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthaldialdehyde." *J Chromatogr* **582**(1-2): 41-8.
- Hashimoto, A. and T. Oka (1997). "Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery." *Prog Neurobiol* **52**(4): 325-53.
- Hashimoto, K., G. Engberg, et al. (2005). "Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**(5): 767-9.
- Hashimoto, K., T. Fukushima, et al. (2003). "Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* **60**(6): 572-6.
- Hashimoto, T., D. W. Volk, et al. (2003). "Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia." *J Neurosci* **23**(15): 6315-26.
- Hatzipetros, T. and B. K. Yamamoto (2006). "Dopaminergic and GABAergic modulation of glutamate release from rat subthalamic nucleus efferents to the substantia nigra." *Brain Res* **1076**(1): 60-7.
- Haydon, P. G. (2001). "GLIA: listening and talking to the synapse." *Nat Rev Neurosci* **2**(3): 185-93.
- Heidbreder, C. A. and A. H. Newman (2010). "Current perspectives on selective dopamine D(3) receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders." *Ann N Y Acad Sci* **1187**: 4-34.
- Heresco-Levy, U., D. C. Javitt, et al. (2005). "D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia." *Biol Psychiatry* **57**(6): 577-85.
- Heresco-Levy, U., D. C. Javitt, et al. (1996). "Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of glycine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia." *Br J Psychiatry* **169**(5): 610-7.
- Hersch, S. M., H. Yi, et al. (1997). "Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra." *J Comp Neurol* **388**(2): 211-27.
- Hirayasu, Y., M. E. Shenton, et al. (1999). "Subgenual cingulate cortex volume in first-episode psychosis." *Am J Psychiatry* **156**(7): 1091-3.

Hoffman, B. J., S. R. Hansson, et al. (1998). "Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system." *Front Neuroendocrinol* **19**(3): 187-231.

Horiike, K., H. Tojo, et al. (1994). "D-amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: regional differentiation of astrocytes." *Brain Res* **652**(2): 297-303.

Hu, G. Y., O. Hvalby, et al. (1987). "Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation." *Nature* **328**(6129): 426-9.

Humeau, Y., H. Shaban, et al. (2003). "Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain." *Nature* **426**(6968): 841-5.

Hussy, N., C. Deleuze, et al. (2000). "Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure." *Prog Neurobiol* **62**(2): 113-34.

I.

Ichikawa, J., H. Ishii, et al. (2001). "5-HT(2A) and D(2) receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT(1A) receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release." *J Neurochem* **76**(5): 1521-31.

Ikeda, K., M. Nagasawa, et al. (1992). "Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel." *FEBS Lett* **313**(1): 34-8.

Ishii, T., K. Moriyoshi, et al. (1993). "Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits." *J Biol Chem* **268**(4): 2836-43.

Ismailov, I., D. Kalikulov, et al. (2004). "The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression." *J Neurosci* **24**(44): 9847-61.

J.

Javitt, D. C. and S. R. Zukin (1991). "Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia." *Am J Psychiatry* **148**(10): 1301-8.

Javitt, D. C., I. Zylberman, et al. (1994). "Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine." *Am J Psychiatry* **151**(8): 1234-6.

Johnson, J. W. and P. Ascher (1987). "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons." *Nature* **325**(6104): 529-31.

Jourdain, P., L. H. Bergersen, et al. (2007). "Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength." *Nat Neurosci* **10**(3): 331-9.

K.

Kang, J., L. Jiang, et al. (1998). "Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission." *Nat Neurosci* **1**(8): 683-92.

- Karakaya, S., M. Kipp, et al. (2007). "Oestrogen regulates the expression and function of dopamine transporters in astrocytes of the nigrostriatal system." *J Neuroendocrinol* **19**(9): 682-90.
- Kasanetz, F., V. Deroche-Gamonet, et al. (2010). "Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity." *Science* **328**(5986): 1709-12.
- Kebabian, J. W. and D. B. Calne (1979). "Multiple receptors for dopamine." *Nature* **277**(5692): 93-6.
- Khan, Z. U., P. Koulen, et al. (2001). "An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1964-9.
- Kim, P. M., H. Aizawa, et al. (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**(6): 2105-10.
- Kirschner, D. L., A. L. Wilson, et al. (2009). "Simultaneous efflux of endogenous D-ser and L-glu from single acute hippocampus slices during oxygen glucose deprivation." *J Neurosci Res* **87**(12): 2812-20.
- Kleckner, N. W. and R. Dingledine (1988). "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." *Science* **241**(4867): 835-7.
- Konno, R., K. Isobe, et al. (1988). "Lack of D-amino-acid oxidase activity causes a specific renal aminoaciduria in the mouse." *Biochim Biophys Acta* **967**(3): 382-90.
- Konno, R. and Y. Yasumura (1983). "Mouse mutant deficient in D-amino acid oxidase activity." *Genetics* **103**(2): 277-85.
- Kotecha, S. A., J. N. Oak, et al. (2002). "A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission." *Neuron* **35**(6): 1111-22.
- Kozlov, A. S., M. C. Angulo, et al. (2006). "Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26): 10058-63.
- Krapivinsky, G., L. Krapivinsky, et al. (2003). "The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1." *Neuron* **40**(4): 775-84.
- Krebs, H. A. (1935). "Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids." *Biochem J* **29**(7): 1620-44.
- Krystal, J. H., L. P. Karper, et al. (1994). "Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses." *Arch Gen Psychiatry* **51**(3): 199-214.
- Kumashiro, S., A. Hashimoto, et al. (1995). "Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases." *Brain Res* **681**(1-2): 117-25.
- Kutsuwada, T., N. Kashiwabuchi, et al. (1992). "Molecular diversity of the NMDA receptor channel." *Nature* **358**(6381): 36-41.
- L.**
- Laming, P. R., H. Kimelberg, et al. (2000). "Neuronal-glia interactions and behaviour." *Neurosci Biobehav Rev* **24**(3): 295-340.

- Lamzin, V. S., Z. Dauter, et al. (1995). "How nature deals with stereoisomers." *Curr Opin Struct Biol* **5** (6): 830-6.
- Landry, Y. (2003). *Pharmacologie, des cibles vers l'indication thérapeutique*. Paris, Dunod.
- Laruelle, M. (2000). "The role of endogenous sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: implications from recent brain imaging studies." *Brain Res Brain Res Rev* **31**(2-3): 371-84.
- Laurie, D. J., J. Putzke, et al. (1995). "The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* **32**(1): 94-108.
- Lee, F. J. and F. Liu (2004). "Direct interactions between NMDA and D1 receptors: a tale of tails." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 6): 1032-6.
- Lee, F. J., S. Xue, et al. (2002). "Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor." *Cell* **111**(2): 219-30.
- Lee, H. K., M. Barbarosie, et al. (2000). "Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity." *Nature* **405**(6789): 955-9.
- Lee, S. P., C. H. So, et al. (2004). "Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal." *J Biol Chem* **279**(34): 35671-8.
- Lewis, D. A. and G. Gonzalez-Burgos (2006). "Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia." *Nat Med* **12**(9): 1016-22.
- Lewis, D. A., T. Hashimoto, et al. (2005). "Cortical inhibitory neurons and schizophrenia." *Nat Rev Neurosci* **6**(4): 312-24.
- Li, B., R. S. Woo, et al. (2007). "The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity." *Neuron* **54**(4): 583-97.
- Lisman, J., H. Schulman, et al. (2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." *Nat Rev Neurosci* **3**(3): 175-90.
- Liu, L., T. P. Wong, et al. (2004). "Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity." *Science* **304**(5673): 1021-4.
- Liu, Q. S., Q. Xu, et al. (2004). "Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3172-7.
- Lledo, P. M., G. O. Hjelmstad, et al. (1995). "Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (24): 11175-9.
- Luby, E. D., B. D. Cohen, et al. (1959). "Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl." *AMA Arch Neurol Psychiatry* **81**(3): 363-9.
- Luscher, C., R. A. Nicoll, et al. (2000). "Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane." *Nat Neurosci* **3**(6): 545-50.
- Lynch, G., J. Larson, et al. (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." *Nature* **305**(5936): 719-21.

M.

- MacDermott, A. B., M. L. Mayer, et al. (1986). "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones." *Nature* **321**(6069): 519-22.
- Mackay, A. V., L. L. Iversen, et al. (1982). "Increased brain dopamine and dopamine receptors in schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* **39**(9): 991-7.
- Madeira, C., M. E. Freitas, et al. (2008). "Increased brain D-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia." *Schizophr Res* **101**(1-3): 76-83.
- Madry, C., H. Betz, et al. (2008). "Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn²⁺ and NR1 antagonist." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34): 12563-8.
- Maggio, R., G. Aloisi, et al. (2009). "Heterodimerization of dopamine receptors: new insights into functional and therapeutic significance." *Parkinsonism Relat Disord* **15 Suppl 4**: S2-7.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." *Neuron* **44**(1): 5-21.
- Malenka, R. C., J. A. Kauer, et al. (1988). "Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission." *Science* **242**(4875): 81-4.
- Malinow, R., H. Schulman, et al. (1989). "Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP." *Science* **245**(4920): 862-6.
- Manzoni, O. J., T. Manabe, et al. (1994). "Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus." *Science* **265**(5181): 2098-101.
- Martineau, M., G. Baux, et al. (2006). "D-serine signalling in the brain: friend and foe." *Trends Neurosci* **29**(8): 481-91.
- Massey, P. V., B. E. Johnson, et al. (2004). "Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression." *J Neurosci* **24**(36): 7821-8.
- Matsuda, Y., A. Marzo, et al. (2006). "The presence of background dopamine signal converts long-term synaptic depression to potentiation in rat prefrontal cortex." *J Neurosci* **26**(18): 4803-10.
- Mayer, M. L., G. L. Westbrook, et al. (1984). "Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones." *Nature* **309**(5965): 261-3.
- McGrath, J., S. Saha, et al. (2008). "Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality." *Epidemiol Rev* **30**: 67-76.
- Meister, B., T. Hokfelt, et al. (1988). "DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tancytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements." *Neuroscience* **27**(2): 607-22.
- Mesters, J. R., C. Barinka, et al. (2006). "Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer." *EMBO J* **25**(6): 1375-84.
- Miller, E. K. and J. D. Cohen (2001). "An integrative theory of prefrontal cortex function." *Annu Rev Neurosci* **24**: 167-202.

- Missale, C., S. R. Nash, et al. (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." *Physiol Rev* **78** (1): 189-225.
- Mitchell, J., P. Paul, et al. (2010). "Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(16): 7556-61.
- Mitchell, S. J. and R. A. Silver (2000). "Glutamate spillover suppresses inhibition by activating presynaptic mGluRs." *Nature* **404**(6777): 498-502.
- Miyazaki, I., M. Asanuma, et al. (2004). "Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia." *Brain Res* **1029**(1): 120-3.
- Mockett, B. G., D. Guevremont, et al. (2007). "Dopamine D1/D5 receptor activation reverses NMDA receptor-dependent long-term depression in rat hippocampus." *J Neurosci* **27**(11): 2918-26.
- Monyer, H., N. Burnashev, et al. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." *Neuron* **12**(3): 529-40.
- Monyer, H., R. Sprengel, et al. (1992). "Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes." *Science* **256**(5060): 1217-21.
- Morishita, W., W. Lu, et al. (2007). "Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression." *Neuropharmacology* **52**(1): 71-6.
- Moriyoshi, K., M. Masu, et al. (1991). "Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor." *Nature* **354**(6348): 31-7.
- Mothet, J. P., A. T. Parent, et al. (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**(9): 4926-31.
- Mothet, J. P., L. Pollegioni, et al. (2005). "Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (15): 5606-11.
- Mulkey, R. M. and R. C. Malenka (1992). "Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus." *Neuron* **9**(5): 967-75.
- Murphy, S. and B. Pearce (1987). "Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells." *Neuroscience* **22**(2): 381-94.
- Mustafa, A. K., A. S. Ahmad, et al. "Serine racemase deletion protects against cerebral ischemia and excitotoxicity." *J Neurosci* **30**(4): 1413-6.
- Nagata, Y. (1992). "Involvement of D-amino acid oxidase in elimination of D-serine in mouse brain." *Experientia* **48**(8): 753-5.

N.

- Nai, Q., S. Li, et al. (2009). "Uncoupling the D1-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent long-term potentiation and working memory." *Biol Psychiatry* **67**(3): 246-54.

Nedergaard, M. (1994). "Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells." *Science* **263**(5154): 1768-71.

Newman, E. A. (2003). "Glial cell inhibition of neurons by release of ATP." *J Neurosci* **23**(5): 1659-66.

Nicoll, R. A. (2003). "Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1432): 721-6.

Nishi, M., H. Hinds, et al. (2001). "Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner." *J Neurosci* **21**(23): RC185.

Nowak, J. Z. (1985). "Depolarisation-evoked release of dopamine and histamine from brain tissue and studies on presynaptic dopamine-histamine interaction." *Pol J Pharmacol Pharm* **37**(3): 359-81.

O.

O'Brien, R. J., L. F. Lau, et al. (1998). "Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses." *Curr Opin Neurobiol* **8**(3): 364-9.

O'Donovan, M. C., N. M. Williams, et al. (2003). "Recent advances in the genetics of schizophrenia." *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**: R125-33.

Oda, S., H. Funato, et al. "Dopamine D5 receptor immunoreactivity is differentially distributed in GABAergic interneurons and pyramidal cells in the rat medial prefrontal cortex." *Brain Res* **1329**: 89-102.

Oliet, S. H., R. Piet, et al. (2001). "Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons." *Science* **292**(5518): 923-6.

Otani, S., O. Blond, et al. (1998). "Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex." *Neuroscience* **85**(3): 669-76.

Owen, F., A. J. Cross, et al. (1978). "Increased dopamine-receptor sensitivity in schizophrenia." *Lancet* **2**(8083): 223-6.

P.

Panatier, A., D. T. Theodosis, et al. (2006). "Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory." *Cell* **125**(4): 775-84.

Park, H. K., Y. Shishido, et al. (2006). "Potential role for astroglial D-amino acid oxidase in extracellular D-serine metabolism and cytotoxicity." *J Biochem* **139**(2): 295-304.

Parpura, V., T. A. Basarsky, et al. (1994). "Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling." *Nature* **369**(6483): 744-7.

Parpura, V. and P. G. Haydon (2000). "Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8629-34.

Parri, H. R., T. M. Gould, et al. (2001). "Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation." *Nat Neurosci* **4**(8): 803-12.

- Pascual, O., K. B. Casper, et al. (2005). "Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks." *Science* **310**(5745): 113-6.
- Pasti, L., A. Volterra, et al. (1997). "Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ." *J Neurosci* **17**(20): 7817-30.
- Peineau, S., C. Bradley, et al. (2008). "The role of GSK-3 in synaptic plasticity." *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**: S428-37.
- Perea, G. and A. Araque (2005). "Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes." *J Neurosci* **25**(9): 2192-203.
- Perea, G. and A. Araque (2005). "Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal." *J Neural Transm* **112**(1): 127-35.
- Piet, R., L. Vargova, et al. (2004). "Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 2151-5.
- Pin, J. P. and F. Acher (2002). "The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology." *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **1**(3): 297-317.
- Polanczyk, G., T. E. Moffitt, et al. (2010). "Etiological and clinical features of childhood psychotic symptoms: results from a birth cohort." *Arch Gen Psychiatry* **67**(4): 328-38.
- Pollegioni, L., L. Piubelli, et al. (2007). "Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans." *Cell Mol Life Sci* **64**(11): 1373-94.
- Porter, J. T. and K. D. McCarthy (1996). "Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals." *J Neurosci* **16**(16): 5073-81.
- Puyal, J., M. Martineau, et al. (2006). "Changes in D-serine levels and localization during postnatal development of the rat vestibular nuclei." *J Comp Neurol* **497**(4): 610-21.

R.

- Ramachandran, V. S. (2002). *Encyclopedia of Human Brain, Four Volume Set*. San Diego, Elsevier.
- Rao, S. G., G. V. Williams, et al. (2000). "Destruction and creation of spatial tuning by disinhibition: GABA(A) blockade of prefrontal cortical neurons engaged by working memory." *J Neurosci* **20**(1): 485-94.
- Rapoport, J. L., J. N. Giedd, et al. (1999). "Progressive cortical change during adolescence in childhood-onset schizophrenia. A longitudinal magnetic resonance imaging study." *Arch Gen Psychiatry* **56**(7): 649-54.
- Reich, D. L. and G. Silvey (1989). "Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience." *Can J Anaesth* **36**(2): 186-97.
- Reynolds, G. P. (1983). "Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia." *Nature* **305**(5934): 527-9.

- Richtand, N. M. and R. K. McNamara (2008). "Serotonin and dopamine interactions in psychosis prevention." *Prog Brain Res* **172**: 141-53.
- Rivera, A., A. Penafiel, et al. (2008). "Cellular localization and distribution of dopamine D(4) receptors in the rat cerebral cortex and their relationship with the cortical dopaminergic and noradrenergic nerve terminal networks." *Neuroscience* **155**(3): 997-1010.
- Roggenhofer, E., P. Fidzinski, et al. (2010). "Activation of dopamine D1/D5 receptors facilitates the induction of presynaptic long-term potentiation at hippocampal output synapses." *Eur J Neurosci* **32** (4): 598-605.
- Rosenberg, D., E. Kartvelishvily, et al. (2010). "Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration." *FASEB J* **24**(8): 2951-61.
- Ross, C. A., R. L. Margolis, et al. (2006). "Neurobiology of schizophrenia." *Neuron* **52**(1): 139-53.

S.

- Sasaki, M., R. Konno, et al. (1992). "A single-base-pair substitution abolishes D-amino-acid oxidase activity in the mouse." *Biochim Biophys Acta* **1139**(4): 315-8.
- Sawaguchi, T., M. Matsumura, et al. (1989). "Delayed response deficits produced by local injection of bicuculline into the dorsolateral prefrontal cortex in Japanese macaque monkeys." *Exp Brain Res* **75** (3): 457-69.
- Scarselli, M., F. Novi, et al. (2001). "D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties." *J Biol Chem* **276**(32): 30308-14.
- Schell, M. J. (2004). "The N-methyl D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**(1446): 943-64.
- Schell, M. J., R. O. Brady, Jr., et al. (1997). "D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors." *J Neurosci* **17**(5): 1604-15.
- Schell, M. J., O. B. Cooper, et al. (1997). "D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 2013-8.
- Schell, M. J., M. E. Molliver, et al. (1995). "D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9): 3948-52.
- Schousboe, A. (2003). "Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission." *Neurochem Res* **28**(2): 347-52.
- Schumacher, J., R. A. Jamra, et al. (2004). "Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder." *Mol Psychiatry* **9**(2): 203-7.
- Seamans, J. K., D. Durstewitz, et al. (2001). "Dopamine D1/D5 receptor modulation of excitatory synaptic inputs to layer V prefrontal cortex neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 301-6.
- Seeman, P., J. Schwarz, et al. (2006). "Psychosis pathways converge via D2high dopamine receptors." *Synapse* **60**(4): 319-46.

-
- Serrano, A., N. Haddjeri, et al. (2006). "GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression." *J Neurosci* **26**(20): 5370-82.
- Shenton, M. E., R. Kikinis, et al. (1992). "Abnormalities of the left temporal lobe and thought disorder in schizophrenia. A quantitative magnetic resonance imaging study." *N Engl J Med* **327**(9): 604-12.
- Simard, M. and M. Nedergaard (2004). "The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis." *Neuroscience* **129**(4): 877-96.
- Snyder, G. L., A. A. Fienberg, et al. (1998). "A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor." *J Neurosci* **18**(24): 10297-303.
- Sokoloff, P. and J. C. Schwartz (1995). "Novel dopamine receptors half a decade later." *Trends Pharmacol Sci* **16**(8): 270-5.
- Sontheimer, H. (1994). "Voltage-dependent ion channels in glial cells." *Glia* **11**(2): 156-72.
- Sowell, E. R., P. M. Thompson, et al. (1999). "In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions." *Nat Neurosci* **2**(10): 859-61.
- Stanwood, G. D., R. P. Artymyshyn, et al. (2000). "Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D3 binding with [(125)I]7-OH-PIPAT: evidence for the presence of D3 receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals." *J Pharmacol Exp Ther* **295**(3): 1223-31.
- Stefansson, H., J. Sarginson, et al. (2003). "Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population." *Am J Hum Genet* **72**(1): 83-7.
- Stefansson, H., E. Sigurdsson, et al. (2002). "Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia." *Am J Hum Genet* **71**(4): 877-92.
- Stevens, E. R., M. Esguerra, et al. (2003). "D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6789-94.
- Straub, R. E., Y. Jiang, et al. (2002). "Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia." *Am J Hum Genet* **71**(2): 337-48.
- Straub, R. E. and D. R. Weinberger (2006). "Schizophrenia genes - famine to feast." *Biol Psychiatry* **60**(2): 81-3.
- Sucher, N. J., S. Akbarian, et al. (1995). "Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain." *J Neurosci* **15**(10): 6509-20.
- Sullivan, E. V., K. O. Lim, et al. (1998). "A profile of cortical gray matter volume deficits characteristic of schizophrenia." *Cereb Cortex* **8**(2): 117-24.
- Sun, X., Y. Zhao, et al. (2005). "Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons." *J Neurosci* **25**(32): 7342-51.

Supplisson, S. and C. Bergman (1997). "Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes." J Neurosci **17**(12): 4580-90.

T.

Takahashi, K., F. Hayashi, et al. (1997). "In vivo evidence for the link between L- and D-serine metabolism in rat cerebral cortex." J Neurochem **69**(3): 1286-90.

Talbot, P. S. and M. Laruelle (2002). "The role of in vivo molecular imaging with PET and SPECT in the elucidation of psychiatric drug action and new drug development." Eur Neuropsychopharmacol **12**(6): 503-11.

Tchivileva, I. E., A. G. Nackley, et al. (2009). "Characterization of NF- κ B-mediated inhibition of catechol-O-methyltransferase." Mol Pain **5**: 13.

Tingley, W. G., M. D. Ehlers, et al. (1997). "Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies." J Biol Chem **272**(8): 5157-66.

Tong, G. and C. E. Jahr (1994). "Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation." Neuron **13**(5): 1195-203.

Tsai, G., L. A. Passani, et al. (1995). "Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains." Arch Gen Psychiatry **52**(10): 829-36.

Tsai, G., P. Yang, et al. (1998). "D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia." Biol Psychiatry **44**(11): 1081-9.

Tseng, K. Y. and P. O'Donnell (2004). "Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms." J Neurosci **24**(22): 5131-9.

U.

Ustun, T. B., J. Rehm, et al. (1999). "Multiple-informant ranking of the disabling effects of different health conditions in 14 countries. WHO/NIH Joint Project CAR Study Group." Lancet **354**(9173): 111-5.

V.

Vaarmann, A., S. Gandhi, et al. (2010). "Dopamine induces Ca²⁺ signaling in astrocytes through reactive oxygen species generated by monoamine oxidase." J Biol Chem **285**(32): 25018-23.

van Berckel, B. N., R. Hijman, et al. (1996). "Efficacy and tolerance of D-cycloserine in drug-free schizophrenic patients." Biol Psychiatry **40**(12): 1298-300.

Ventura, R. and K. M. Harris (1999). "Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes." J Neurosci **19**(16): 6897-906.

Verkhatsky, A., R. K. Orkand, et al. (1998). "Glial calcium: homeostasis and signaling function." Physiol Rev **78**(1): 99-141.

- Verrall, L., P. W. Burnet, et al. "The neurobiology of D-amino acid oxidase and its involvement in schizophrenia." *Mol Psychiatry* **15**(2): 122-37.
- Vincent, S. L., Y. Khan, et al. (1993). "Cellular distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex." *J Neurosci* **13**(6): 2551-64.
- Vincent, S. L., Y. Khan, et al. (1995). "Cellular colocalization of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex." *Synapse* **19**(2): 112-20.
- Volk, D., M. Austin, et al. (2001). "GABA transporter-1 mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia: decreased expression in a subset of neurons." *Am J Psychiatry* **158**(2): 256-65.
- Volk, D. W., J. N. Pierri, et al. (2002). "Reciprocal alterations in pre- and postsynaptic inhibitory markers at chandelier cell inputs to pyramidal neurons in schizophrenia." *Cereb Cortex* **12**(10): 1063-70.
- Volterra, A. and J. Meldolesi (2005). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." *Nat Rev Neurosci* **6**(8): 626-40.

W.

- Wake, K., H. Yamazaki, et al. (2001). "Exaggerated responses to chronic nociceptive stimuli and enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in mutant mice lacking D-amino-acid oxidase." *Neurosci Lett* **297**(1): 25-8.
- Wang, J. and P. O'Donnell (2001). "D(1) dopamine receptors potentiate nmda-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons." *Cereb Cortex* **11**(5): 452-62.
- Wang, L. Z. and X. Z. Zhu (2003). "Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development." *Acta Pharmacol Sin* **24**(10): 965-74.
- Wang, X., P. Zhong, et al. (2003). "Regulation of NMDA receptors by dopamine D4 signaling in prefrontal cortex." *J Neurosci* **23**(30): 9852-61.
- Watanabe, M., M. Mishina, et al. (1994). "Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brainstem." *J Comp Neurol* **343**(4): 520-31.
- Watanabe, M., M. Mishina, et al. (1994). "Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum." *J Comp Neurol* **343**(4): 513-9.
- Wedzony, K., A. Chocyk, et al. (2000). "Cortical localization of dopamine D4 receptors in the rat brain--immunocytochemical study." *J Physiol Pharmacol* **51**(2): 205-21.
- Wenzel, A., M. Villa, et al. (1996). "Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain." *J Neurochem* **66**(3): 1240-8.
- Westphal, R. S., S. J. Tavalin, et al. (1999). "Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex." *Science* **285**(5424): 93-6.
- Wolosker, H., S. Blackshaw, et al. (1999). "Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13409-14.

Wolosker, H., K. N. Sheth, et al. (1999). "Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 721-5.

Woo, T. U., R. E. Whitehead, et al. (1998). "A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5341-6.

Wu, S., S. W. Barger, et al. (2004). "Schwann cell and epineural fibroblast expression of serine racemase." *Brain Res* **1020**(1-2): 161-6.

Wu, S. Z., A. M. Bodles, et al. (2004). "Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide." *J Neuroinflammation* **1**(1): 2.

X.

Xia, Z. and D. R. Storm (2005). "The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* **6**(4): 267-76.

Xu, T. X., T. D. Sotnikova, et al. (2009). "Hyperdopaminergic tone erodes prefrontal long-term potential via a D2 receptor-operated protein phosphatase gate." *J Neurosci* **29**(45): 14086-99.

Y.

Yamamoto, B. K. and S. Davy (1992). "Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis." *J Neurochem* **58**(5): 1736-42.

Yang, S. N., Y. G. Tang, et al. (1999). "Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic [Ca²⁺]_i elevation." *J Neurophysiol* **81**(2): 781-7.

Yang, Y., W. Ge, et al. (2003). "Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15194-9.

Yasuda, H., A. L. Barth, et al. (2003). "A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction." *Nat Neurosci* **6**(1): 15-6.

Yoshikawa, M., N. Takayasu, et al. (2007). "The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons." *Arch Histol Cytol* **70**(2): 127-34.

Youdim, M. B. and Y. S. Bakhle (2006). "Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness." *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S287-96.

Z.

Zhang, J. M., H. K. Wang, et al. (2003). "ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression." *Neuron* **40**(5): 971-82.

Zheng, P., X. X. Zhang, et al. (1999). "Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine." *Neuroscience* **91**(2): 527-35.

Publications personnelles



ELSEVIER

Neurobiology of Aging xxx (2009) xxx–xxx

**NEUROBIOLOGY
OF
AGING**

www.elsevier.com/locate/neuaging

Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function

F.R. Turpin^{a,b,c}, B. Potier^a, J.R. Dulong^{b,c}, P.-M. Sinet^a, J. Alliot^d, S.H.R. Oliet^{b,c}, P. Dutar^a, J. Epelbaum^a, J.-P. Mothet^{b,c}, J.-M. Billard^{a,*}

^a Centre de Psychiatrie et Neurosciences, INSERM, UMR 894, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, Paris, F-75014, France

^b INSERM U862, Neurocentre Magendie, Bordeaux, F-33077, France

^c Université de Bordeaux, Bordeaux, F-33077, France

^d Laboratoire de Neuroendocrinologie du Vieillessement, Complexe Scientifique des Cèzeaux, Université Blaise Pascal, Aubière, F-63177, France

Received 15 May 2009; received in revised form 25 August 2009; accepted 6 September 2009

Abstract

To gain insight into the contribution of D-serine to impaired cognitive aging, we compared the metabolic pathway and content of the amino acid as well as D-serine-dependent synaptic transmission and plasticity in the hippocampus of young and old rats of the Wistar and Lou/C/Jall strains. Wistar rats display cognitive impairments with aging that are not found in the latter strain, which is therefore considered a model of healthy aging. Both mRNA and protein levels of serine racemase, the D-serine synthesizing enzyme, were decreased in the hippocampus but not in the cerebral cortex or cerebellum of aged Wistar rats, whereas the expression of D-amino acid oxidase, which degrades the amino acid, was not affected. Consequently, hippocampal levels of endogenous D-serine were significantly lower. In contrast, serine racemase expression and D-serine levels were not altered in the hippocampus of aged Lou/C/Jall rats. *Ex vivo* electrophysiological recordings in hippocampal slices showed a marked reduction in N-methyl-D-aspartate-receptor (NMDA-R)-mediated synaptic potentials and theta-burst-induced long-term potentiation (LTP) in the CA1 area of aged Wistar rats, which were restored by exogenous D-serine. In contrast, NMDA-R activation, LTP induction and responses to D-serine were not altered in aged Lou/C/Jall rats.

These results further strengthen the notion that the serine racemase-dependent pathway is a prime target of hippocampus-dependent cognitive deficits with aging. Understanding the processes that specifically affect serine racemase during aging could thus provide key insights into the treatment of memory deficits in the elderly.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

Keywords: D-serine; Memory; Synaptic plasticity; NMDA receptor; Hippocampus

Abbreviations: aCSF, artificial cerebrospinal fluid; DAAO, D-amino acid oxidase; D-APV, D-2-amino-5-phosphonovalerate; fEPSP, field excitatory postsynaptic potentials; LTP, long-term potentiation; mRNA, messenger RNA; M-MLV, Moloney Murine Leukemia Virus; NBQX, 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzoquinoline-7-sulfonamide; NMDA-R, N-methyl-D-aspartate-receptor; PFV, presynaptic fiber volley; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author at: Centre de Psychiatrie et Neurosciences, U894, Faculté de médecine, Université Paris Descartes, 2 ter rue d'Alésia, 75014, Paris, France. Tel.: +33 1 40 78 86 47; fax: +33 1 45 80 72 93.

E-mail addresses: fabrice.turpin@inserm.fr (F.R. Turpin), brigitte.potier@inserm.fr (B. Potier), jerome.dulong@inserm.fr (J.R. Dulong), pierre-marie.sinet@inserm.fr (P.-M. Sinet), Josette.ALLIOT@univ-bpclermont.fr (J. Alliot), stephane.oliet@inserm.fr (S.H.R. Oliet), patrick.dutar@inserm.fr (P. Dutar), jacques.epelbaum@inserm.fr (J. Epelbaum), jean-pierre.mothet@inserm.fr (J.-P. Mothet), jean-marie.billard@inserm.fr (J.-M. Billard).

0197-4580/\$ – see front matter © 2009 Published by Elsevier Inc.

doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.001

Please cite this article in press as: Turpin, F.R., et al., Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiol. Aging* (2009), doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.001

1. Introduction

Our modern society is characterized by a constant increase in life expectancy that is driven by progress in medical care, hygiene and nutrition. On the other side of the coin, we have a concomitant increase in age-related cognitive defects, which now represent a major burden both at the medical, social and economic levels. Extensive studies of animal models of cognitive aging, notably those that examine hippocampus-related memory capacities (see Billard, 2006 for a review), indicate that memory deficits are linked to an impaired ability of the brain to drive calcium (Ca^{2+})-dependent plasticity of synaptic communication between neurons (Landfield and Lynch, 1977; Barnes, 1985; Landfield et al., 1986). This plasticity is a major property of the neuronal networks underlying memory formation (Barnes, 1995; Eichenbaum, 1996; Dun et al., 2008). Age-related deficits in synaptic plasticity are likely to reflect a shift in Ca^{2+} sources, with a weaker role for the *N*-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors (NMDA-R) and an increased contribution of voltage-gated Ca^{2+} channels and intracellular stores with different kinetic properties (Kumar and Foster, 2005; Gant et al., 2006; Shankar et al., 1998; Foster, 2007; Thibault et al., 2007). However, the exact nature of the mechanisms underlying the age-related NMDA-R deficit remains open to discussion. The importance of a decrease in receptor density, as proposed previously (Adams et al., 2001; Clayton et al., 2002; Magnusson et al., 2002), was recently challenged by a study of the Lou/C/Jall strain of rats, a model of healthy aging (Alliot et al., 2002). In these animals, no obvious age-related memory impairments have yet been characterized, despite a significant loss of NMDA-R (Kollen et al., 2008). Interestingly, the impaired NMDA-R activity and synaptic plasticity that occur in aged rats of other strains (Barnes et al., 1997; Potier et al., 2000; Clayton et al., 2002) are rescued by saturating doses of D-serine, the endogenous ligand of the strychnine-insensitive glycine-binding site of the NMDA-R (Junjaud et al., 2006; Mothet et al., 2006). D-serine is synthesized from the L-isomer by direct racemization catalyzed by serine racemase, an enzyme initially localized in astrocytes but recently also found in neurons (Yasuda et al., 2001; Chumakov et al., 2002; Martineau et al., 2006; Olier and Mothet, 2006; Wolosker, 2007; Miya et al., 2008). On the other hand, D-serine is degraded by D-amino acid oxidase (DAAO), a flavoprotein confined to astrocytes (Horiike et al., 1994; Schell et al., 1995; Urai et al., 2002).

Since it has been demonstrated that D-serine is needed for the activation of NMDA-R and the induction of NMDA-R-dependent synaptic plasticity (Yang et al., 2003), we attempted to obtain further evidence for the involvement of changes in the D-serine pathway in cognitive aging (see Junjaud et al., 2006; Mothet et al., 2006). In this study, we therefore determined and compared the expression of D-serine-related enzymes, the cerebral availability of this NMDA-R co-agonist, and synaptic plasticity in Lou/C/Jall and Wistar rats.

2. Methods

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/809/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures, and were approved by the local ethics committee. The experiments were conducted with 4–6-month-old “young” ($n = 14$) and 25–29-month-old “aged” ($n = 17$) male Wistar rats purchased from Charles River (France) and 4–6-month-old “young” ($n = 11$) and 25–29-month-old “aged” ($n = 18$) Lou/C/Jall rats bred at the Complexe Scientifique des Cézeaux (Université Blaise-Pascal, Aubière, France). Rats were housed by threes in Plexiglas cages and maintained on a controlled light-dark cycle at constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), with *ad libitum* access to food and water.

2.1. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was prepared from frozen tissues using the Rneasy Mini Kit (Qiagen). Total RNA was converted to cDNA using the Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase and random hexanucleotide primers. Primers for serine racemase (sense: 5'-GATTCGAGGTGCCCTTAACG-3'; antisense: 5'-TTGGGCTTCCCTTCTAAAGTATCA-3'), DAAO (sense: 5'-CCTCAGGTCCGGCTAGAAAGA-3'; antisense: 5'-GGATGACCTCTGCACTTGAAGAT-3') and β -actin (sense: 5'-CCACTGCCGCATCCTCTT-3'; antisense: 5'-TGACCGTCAGGCAGCTCAT-3') were designed using PrimerExpress (Applied Biosystems). PCR (20 μl total volume) was performed with Sybr Green PCR master mix following standard protocol on an ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Raw Ct values were obtained with SDS version 2.0 software and were used to calculate relative expression levels.

2.2. Semi-quantitative immunoblotting analysis

Western blot analysis was performed as described previously (Puyal et al., 2002). Briefly, after cell lysis, protein extracts were subjected to electrophoresis (12% SDS-polyacrylamide gel) and electroblotted onto polyvinylidene fluoride membranes (Immobilon-P, Millipore). Membranes were probed with polyclonal antibodies to DAAO (1:2000, Nordic Immunological Laboratories, The Netherlands), serine racemase (1:200, Santa Cruz Biotechnology, UK) and β -actin (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. After washing, they were incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat immunoglobulin G secondary antibodies (1:2000, Vector Laboratories Burlingame, USA). Immunoblots were developed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences, UK) using X-ray films (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, UK). Molecular sizes were estimated by separating prestained molecular weight markers

(6.5–175 kDa) in parallel (New England BioLabs, UK). Protein bands of interest were analyzed by measuring optical density (OD) using scanning densitometry. Densitometric results for serine racemase and DAAO were normalized to β -actin density.

2.3. Determination of D-serine content in hippocampal tissues

Free amino acids were extracted with trichloroacetic acid from pooled hippocampal tissues of young and aged rats respectively, according to published procedures (Schell et al., 1997). HPLC analysis was performed by precolumn derivatization of samples using *o*-phthalaldehyde and *N*-acetylcysteine, and diastereoisomers were resolved in the isocratic phase on a C18 Nova-Pak column. The amount of D-serine was adjusted to protein content as determined by a Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories). D-serine standards were used to normalize the results.

2.4. Electrophysiology

Transverse hippocampal slices (400 μ m) were obtained as previously described (Potier et al., 2000) in rats anesthetized with halothane before decapitation. Slices were prepared in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) and placed in a holding chamber for at least 1 h. The composition of aCSF was as follows (in mM): NaCl 124, KCl 3.5, MgSO₄ 1.5, CaCl₂ 2.3, NaHCO₃ 26.2, NaH₂PO₄ 1.2, and glucose 11, pH 7.4. A single slice was transferred to the recording chamber at a time and continuously superfused with aCSF pre-gassed with 95% O₂/5% CO₂.

Extracellular recordings were obtained at 25–30 °C from the apical dendritic layer of the CA1 area using micropipettes filled with 2 M NaCl. Presynaptic fiber volleys (PFVs) and field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by electrical stimulation of Schaffer collaterals and commissural fibers located in the *stratum radiatum*. NMDA-R-mediated fEPSPs were recorded in slices perfused with low-Mg²⁺ (0.1 mM) aCSF supplemented with the AMPA/kainate receptor antagonist 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzoquinoline-7-sulfonamide (NBQX, 10 μ M) and picrotoxin (10 μ M) to block inhibitory neurotransmission. CA3 and CA1 were separated by a knife cut to prevent the propagation of epileptiform discharges. The averaged slope of three PFVs and fEPSPs was measured using Acquis 1 software (CNRS, Paris, France). To evaluate the level of receptor activation, the fEPSP/PFV ratio was plotted against stimulus intensity (300, 400 or 500 μ A). The effects of exogenous D-serine (100 μ M) were assessed by determining the fEPSP/PFV ratio 15 min after the addition of the co-agonist to the aCSF.

In order to investigate long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission, a test stimulus was applied every 15 s in control medium and adjusted to get a fEPSP with a baseline slope of 0.1 V/s. The averaged slope of three fEPSPs was

measured for 15 min before theta-burst stimulation (TBS), consisting of five trains of four 100 Hz pulses each, separated by 200 ms and delivered at the test intensity. This sequence was repeated three times with an interburst interval of 10 s. Testing with a single pulse was then resumed for 60 min to determine the level of LTP. In pharmacological experiments, all drugs were applied to the aCSF 10 min before the establishment of baseline, and maintained throughout the recording. The drugs applied included NBQX; 10 μ M in DMSO), D-2-amino-5-phosphonovalerate (D-APV, 30–50 μ M), D-serine (100 μ M) and picrotoxin (10 μ M in DMSO) (all from Tocris, Illkirch, France).

2.5. Data analysis

All results are expressed as mean \pm S.E.M. In order to take into account the correlations inherent in repeated measures data, *p*-values were calculated using multivariate analyses of variance followed by post-hoc unpaired *t*-tests. In all cases, differences were considered significant when *p* \leq 0.05.

3. Results

3.1. Serine racemase expression is specifically altered in the hippocampus of aged Wistar rats

Quantitative PCR (Fig. 1A₁) and western blotting (Fig. 1B₁) revealed that serine racemase messenger RNA (mRNA) and protein levels were significantly decreased (–47.8%, *p* < 0.05, *n* = 5 and –25.1%, *p* < 0.01, *n* = 5 respectively) in the hippocampus of aged Wistar rats. In contrast, transcripts and protein levels of the D-serine degrading enzyme DAAO were not significantly modified (Fig. 1A₁ and B₁). It is worth noting that mRNA levels of the glutamate metabolizing enzyme glutamine synthetase were not affected (+8.7%, non-significant, *n* = 5), supporting the idea that the glutamine/glutamate cycle is not altered during aging. Importantly, the weaker expression of serine racemase in aged Wistar rats was not observed in the hippocampus of aged Lou/C/Jall rats, in which neither mRNA nor protein levels were significantly different from those of young animals (Fig. 1A₂ and B₂). The expression of DAAO also remained unaffected in these animals.

Interestingly, the deficit in the expression of serine racemase in aged Wistar rats was specific to the hippocampus (Fig. 2). Indeed, no relevant changes were observed in the mRNA (Fig. 2A) and protein (Fig. 2B) levels of serine racemase or DAAO in the cerebral or cerebellar cortex of the same animals.

3.2. D-serine content is lower in the hippocampus of aged Wistar rats but not Lou/C/Jall rats

Since serine racemase expression is affected in aged Wistar rats but not in Lou/C/Jall rats, we investigated the levels

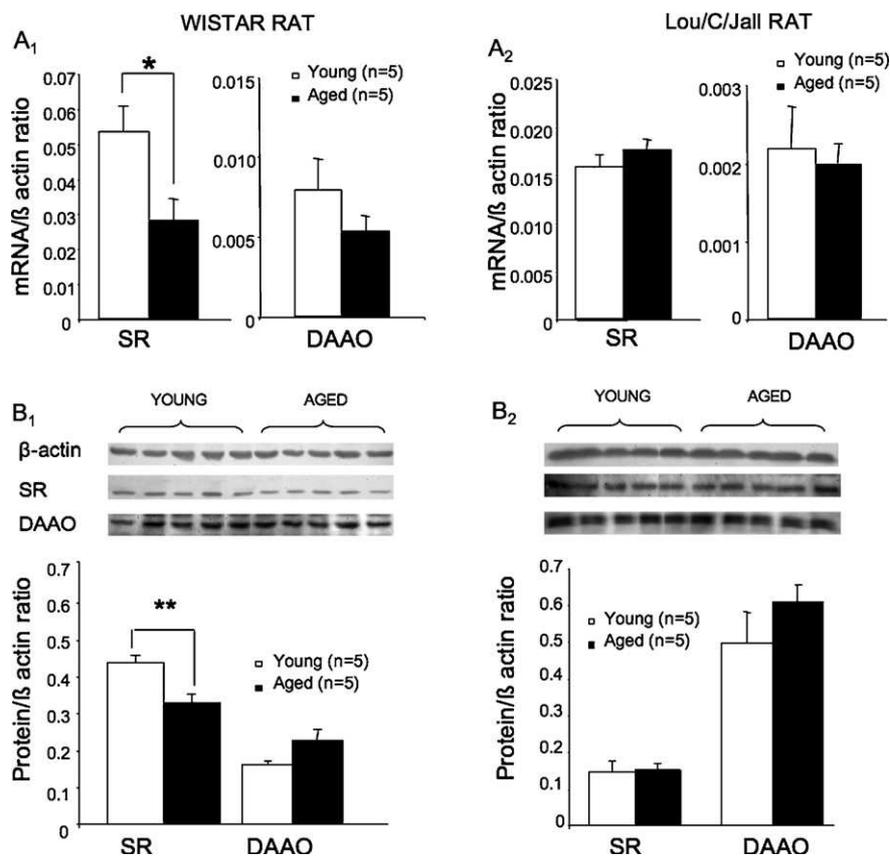


Fig. 1. D-serine biosynthesis is impaired and its tissue availability is reduced in the hippocampus of aged Wistar but not Lou/C/Jall rats. (A) mRNA levels of serine racemase (SR) and D-amino acid oxidase (DAAO) in young and aged Wistar (A₁) and Lou/C/Jall (A₂) rats, normalized to β -actin (* $p < 0.05$). (B, top) Immunoblots for β -actin (upper band), SR (middle band) and (DAAO) (lower band) in young and old Wistar (B₁) and Lou/C/Jall (B₂) rats; 10 μ g of protein were loaded per lane. (B, bottom) Bar graphs depicting quantification of immunoreactivity for SR and DAAO in young and aged Wistar (B₁) and Lou/C/Jall (B₂) rats, normalized to β -actin protein levels (** $p < 0.01$).

of endogenous D-serine in the hippocampus of young and old subjects of these two strains. Using HPLC analysis, we found that the tissue availability of D-serine was differentially affected by age in the two types of animals. In the hippocampus of Wistar rats, the amount of the amino acid decreased significantly from 25.6 ± 0.7 nmol/mg of protein in young animals to 13.5 ± 2.9 nmol/mg of protein in aged animals ($p < 0.01$, $n = 4$). In contrast, the analysis of endogenous D-serine levels in aged Lou/C/Jall rats did not reveal any significant change between young (17.8 ± 1.3 nmol/mg of protein, $n = 5$) and old (15.1 ± 0.9 nmol/mg of protein, $n = 5$) animals.

3.3. D-serine-mediated NMDA-R activation and synaptic plasticity are impaired in the hippocampus of aged Wistar but not Lou/C/Jall rats

There is growing evidence that D-serine serves as a ligand at the strychnine-insensitive glycine site of NMDA-R in many regions of the brain, notably in the hippocampus (see Billard, 2008 for a review). In light of the differential impact of aging on D-serine availability in hippocampal tissues of aged Wistar and Lou/C/Jall rats, we next determined whether the activa-

tion of NMDA-R and the induction of synaptic plasticity were differentially affected by aging in the two rat strains.

3.3.1. NMDA-R-mediated activity

In the hippocampus of Wistar rats, the magnitude of isolated NMDA-R fEPSPs, blocked by the specific antagonist D-APV at the end of the recording, was weaker in aged animals than in young ones, whereas the amplitude of PFVs was not affected (Fig. 3A₁). Consequently, the fEPSP/PFV ratio was significantly decreased [$F_{1,18} = 4.8$, $p < 0.05$] (Fig. 3B₁), in accordance with impaired NMDA-R activity in aged Wistar rats. When D-serine was added at a saturating dose (100 μ M), the fEPSP/PFV ratio was significantly increased in both young ($22.5 \pm 5.8\%$, $p < 0.05$, $n = 6$) and aged animals ($54.2 \pm 11.9\%$, $p < 0.01$, $n = 7$). Nevertheless, it is worth noting that the potentiating effect of exogenous D-serine was significantly higher in aged rats than in young rats ($p < 0.05$; Fig. 3C₁), supporting the idea that ambient levels of D-serine are decreased and that a lower number of NMDA-R are thus recruited by synaptic stimulation in old rats. In the presence of exogenous D-serine, this age-associated decrease in isolated NMDA-R-mediated synaptic potentials was completely reversed [$F_{1,18} = 0.02$, non-significant] (Fig. 3D₁).

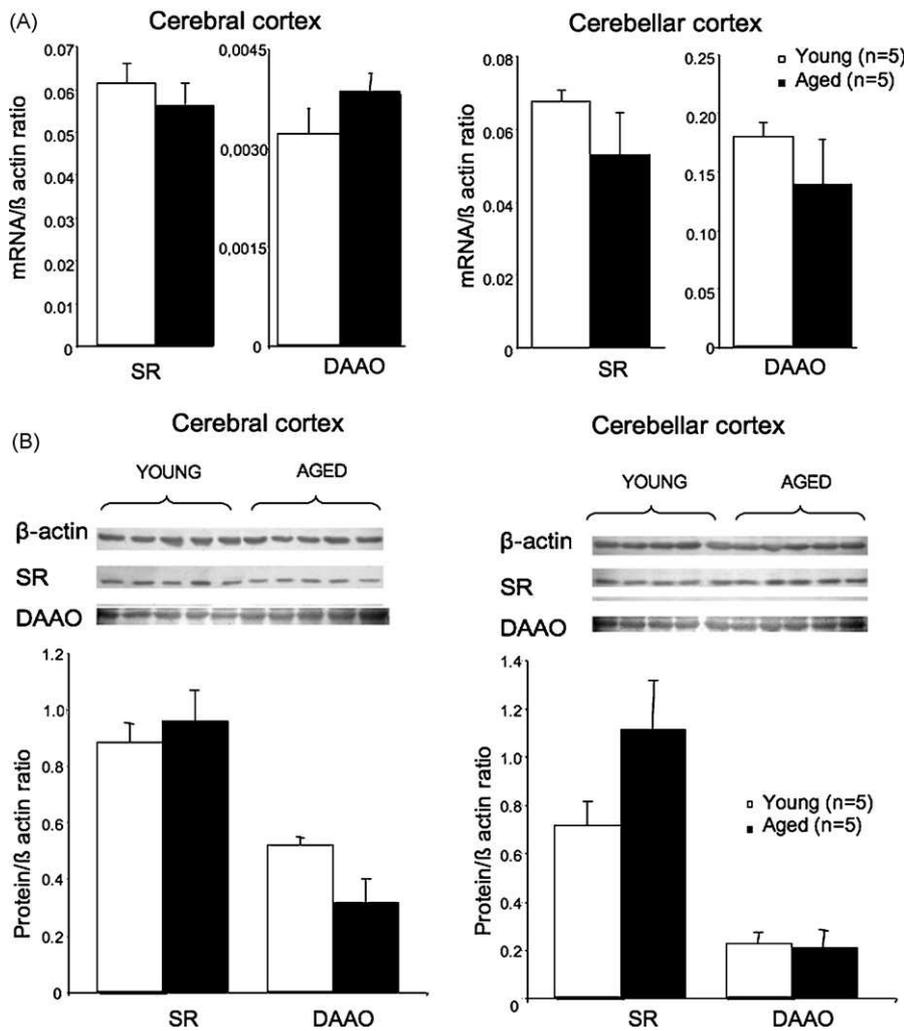


Fig. 2. Serine racemase expression is not impaired in the cerebral or cerebellar cortex of aged Wistar rats. (A) mRNA levels of serine racemase (SR) and D-amino acid oxidase (DAAO) in the cerebral (left panel) and cerebellar cortex (right panel) of young and aged Wistar rats, normalized to β-actin. (B, top) Immunoblots for β-actin (upper band), SR (middle band) and (DAAO) (lower band) in the cerebral (left) and cerebellar (right) cortex of young and aged Wistar rats. (B, bottom) Bar graphs depicting quantification of immunoreactivity for SR and DAAO in the two brain areas, normalized to β-actin protein levels.

Remarkably, a similar analysis of the fEPSP/PVF ratio in young ($n = 5$) and old ($n = 5$) animals of the Lou/C/Jall rat strain showed no alteration in isolated NMDA-R synaptic potentials (Fig. 3A₂) with age [$F_{1,17} = 0.6$, non-significant] (Fig. 3B₂). Furthermore, the addition of exogenous D-serine significantly increased the fEPSP/PVF ratio to the same extent in the two age groups ($21.9 \pm 9.6\%$ in young rats vs. $31.2 \pm 12.8\%$ in aged rats) (Fig. 3C₂), and NMDA-R activation in the presence of saturating doses of this co-agonist was thus similar in young and aged Lou/C/Jall rats [$F_{1,17} = 1.3$, non-significant] (Fig. 3D₂).

3.3.2. Theta-burst-induced LTP

Because of the pivotal role of NMDA-R activation in mediating synaptic plasticity, we studied theta-burst-induced LTP in the CA1 region of both strains of animals.

In Wistar rats, the magnitude of D-APV-sensitive LTP was significantly reduced in slices from aged rats ($n = 8$) in com-

parison to slices from young animals ($n = 11$) [$F_{81,1377} = 1.7$, $p < 0.0001$] (Fig. 4A₁). The addition of D-serine ($100 \mu\text{M}$) did not affect the magnitude of hippocampal LTP in slices from young rats [$F_{81,1620} = 0.6$, non-significant, $n = 11$]. Interestingly, in the presence of the D-amino acid, LTP was significantly enhanced in the aged group [$F_{81,1377} = 2$, $p < 0.0001$, $n = 11$] to reach values similar to that obtained in young animals [$F_{81,1620} = 0.5$, non-significant]. These data indicate that the age-related deficits in LTP were reversed by D-serine supplementation (Fig. 4B₁).

In the hippocampus of aged Lou/C/Jall rats, the magnitude of theta-burst-induced LTP ($n = 10$) was similar to that observed in slices from young animals [$F_{1,1482} = 0.2$, non-significant, $n = 11$] (Fig. 4A₂). Adding D-serine to these slices did not affect the amplitude or the time-course of LTP in either young [$F_{1,1482} = 0.5$, non-significant, $n = 10$] or aged animals [$F_{1,1326} = 0.4$, non-significant, $n = 9$]. Furthermore, LTP induced in the presence of saturating doses of the co-

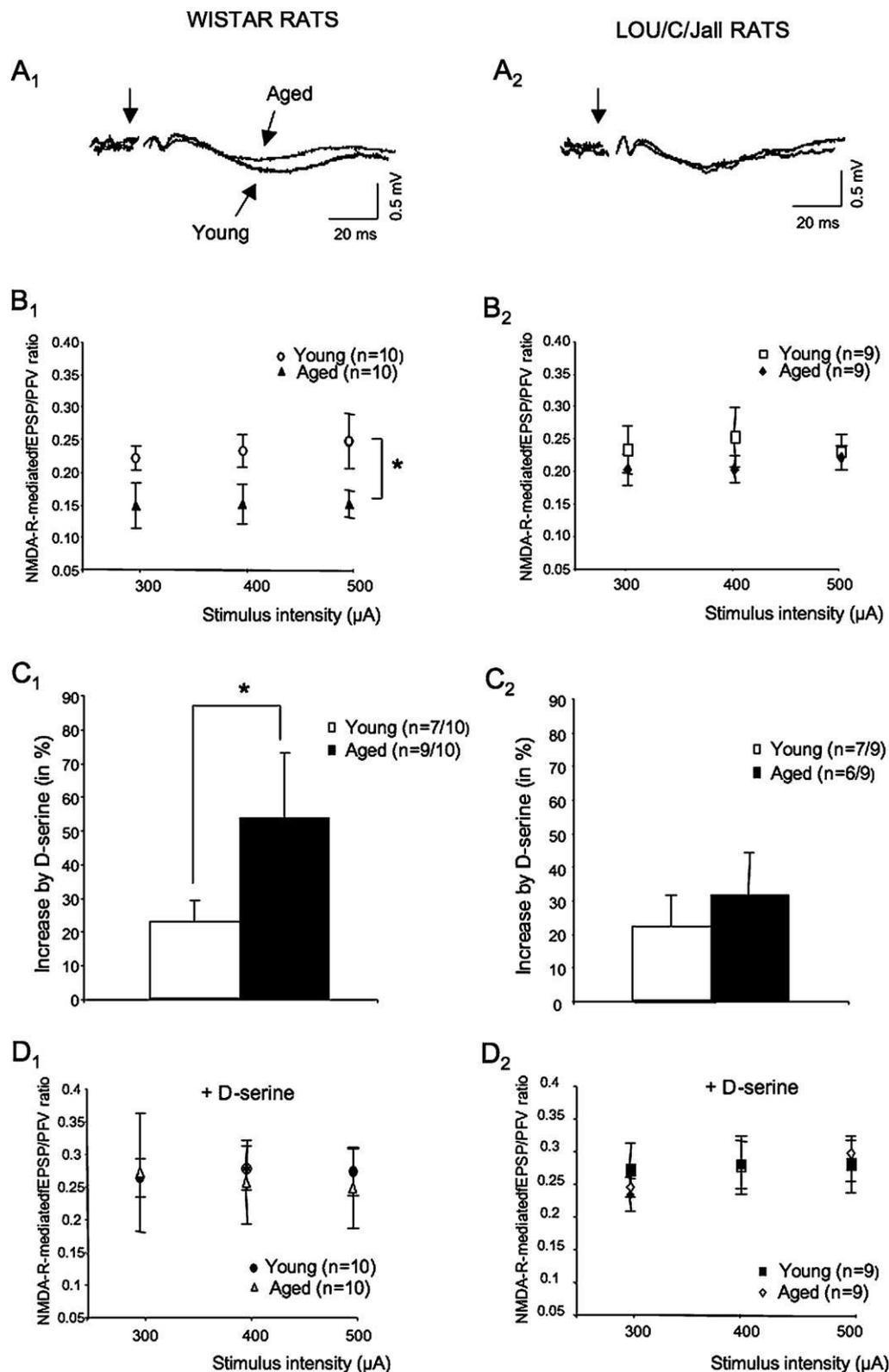


Fig. 3. NMDA-R activation is impaired in aged Wistar but not Lou/C/Jall rats, and the impairment is reversed by D-serine. (A) Superimposed sample traces of NMDA-R-mediated evoked fEPSPs induced by the electrical stimulation of glutamatergic afferents in the *stratum radiatum* of a young and an aged Wistar (A₁) and Lou/C/Jall rat (A₂) respectively. Recordings were made in aCSF containing the AMPA-R antagonist NBQX (10 μ M) and the GABA_A antagonist picrotoxin (10 μ M). Traces are the average of three consecutive responses obtained with a stimulus intensity of 300 μ A. (B) Comparison of NMDA-R-mediated fEPSP/PFV ratio calculated at a stimulus intensity of 300, 400 and 500 μ A in young ($n=6$) and aged ($n=7$) Wistar (B₁) and young ($n=5$) and aged ($n=5$) Lou/C/Jall rats (B₂) (* p <0.05). (C) Bar graphs showing the facilitation of fEPSP amplitude by exogenous

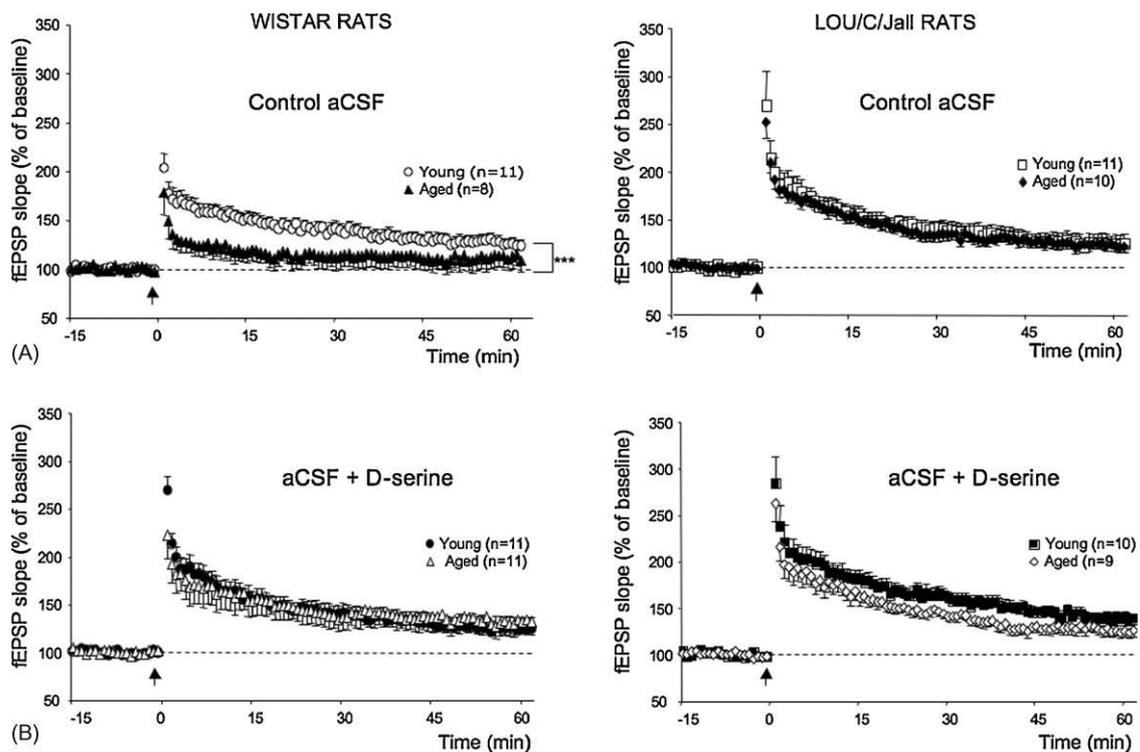


Fig. 4. LTP induced by theta-burst stimulation (TBS) is impaired in aged Wistar but not Lou/C/Jall rats, and the deficit is reversed by D-serine. (A) Time-course of mean TBS-induced LTP calculated from slices of young ($n=8$) and aged ($n=7$) Wistar (A_1) and young ($n=8$) and aged ($n=7$) Lou/C/Jall rats (A_2) ($***p < 0.001$). (B) Time-course of mean TBS-induced LTP calculated in the presence of exogenous D-serine ($100 \mu\text{M}$) from slices of young ($n=9$) and aged ($n=9$) Wistar (B_1) and young ($n=7$) and aged ($n=7$) Lou/C/Jall rats (B_2). In (A) and (B), the number of recorded slices is indicated in parentheses.

agonist was not significantly different in young and aged animals [$F_{1,1326} = 0.3$, non-significant] (Fig. 4B₂).

4. Discussion

In the CNS, the amino acid D-serine is now considered the main endogenous co-agonist for the activation of NMDA-R (Mothet et al., 2000, 2006; Yang et al., 2003; Shleper et al., 2005; Panatier et al., 2006), a glutamate receptor subtype critically involved in the Ca^{2+} -dependent synaptic plasticity underlying learning and memory (Izquierdo, 1991; Lynch, 1998; Lisman and McIntyre, 2001). By comparing animal models of intact and impaired hippocampal-related cognitive function during aging, we provide biochemical and electrophysiological data indicating that the sustained expression of the D-serine synthesizing enzyme serine racemase correlates with preserved hippocampal synaptic plasticity and, consequently, learning and memory abilities at an advanced age.

Specifically, we show here that in aged Wistar rats, classically known to display declines in hippocampus-related memory (Wyss et al., 2000; Sykova et al., 2002), NMDA-R-mediated activity is impaired in the hippocampus, as

previously reported for other strains of rats (Barnes et al., 1997; Eckles-Smith et al., 2000; Potier et al., 2000; Clayton et al., 2002; Mothet et al., 2006). Additionally, NMDA-R-dependent synaptic plasticity is altered in these animals, although basal Ca^{2+} levels are increased (Ossowska et al., 2001; Dyall et al., 2007). These deficits are reversed by the addition of exogenous D-serine, even though NMDA-R density is significantly reduced in these animals (Ossowska et al., 2001; Dyall et al., 2007). D-serine could therefore restore the spatiotemporal pattern of Ca^{2+} influx through the NMDA-R required for the expression of LTP in aged neurons. The hippocampus of aged Lou/C/Jall rats also displays a significant reduction in NMDA-R expression (Kollen et al., 2008). However, our study indicates that substantial levels of D-serine are maintained in this structure throughout life. Since Lou/C/Jall rats do not exhibit any changes in NMDA-R-mediated synaptic potentials or theta-burst-induced LTP, our data suggest that the impairment of NMDA-R activity that normally occurs with age could result at least in part from a diminished availability of D-serine in the synaptic cleft. In light of the recent report that the genetic deletion of serine racemase affects synaptic plasticity in the hippocampus while simultaneously impairing spatial memory in animals (Basu et al., 2009), our present findings further underscore the contribution of altered

D-serine ($100 \mu\text{M}$) in young and aged Wistar (C_1) and Lou/C/Jall rats (C_2) ($*p < 0.05$). (D) Comparison of the fEPSP/PFV ratio in both strains of animals in the presence of D-serine ($100 \mu\text{M}$). In (B)–(D), the number of recorded slices is indicated in parentheses.

D-serine-mediated effects to impaired cognitive function during aging. It is worth noting that age-related deficits in spatial memory in rats (Baxter et al., 1994; Aura et al., 1998; Aura and Riekkinen, 2000) and the disruption of associative eye-blink conditioning in old rabbits (Thompson et al., 1992; Thompson and Disterhoft, 1997) are both rescued by chronic treatment with D-cycloserine, a D-serine-related compound preferentially used to avoid the side effects encountered with D-serine itself.

In this study, we have characterized the main process responsible for the age-related decrease in D-serine availability. The fact that the expression of serine racemase, which catalyzes the conversion of L-serine to D-serine, is weakened while the levels of the D-serine degrading enzyme DAAO are not modified, indicates that the lower levels of this endogenous NMDA-R co-agonist in aged tissues is mainly the result of compromised biosynthesis, as has been suggested previously (Junjaud et al., 2006; Mothet et al., 2006). In accordance with this, serine racemase expression is not affected in aged Lou/C/Jall rats with intact memory, in which substantial levels of D-serine are maintained. It is interesting to note that the age-related decrease in serine racemase expression is restricted to the hippocampal formation and does not occur in other brain structures enriched in D-serine, such as the cerebral cortex. However, declines in prefrontal cognitive functions including working memory also occur during aging (Nielsen-Bohman and Knight, 1995; Raz et al., 1997; Rypma and D'Esposito, 2000; Bimonte et al., 2003; Moore et al., 2003; Makris et al., 2007). Taken together, these results suggest that the aging process targets different cellular and molecular determinants underlying memory capacities, depending on the brain areas concerned. While D-serine-dependent mechanisms are mainly involved in the hippocampus, this is probably not the case in the cerebral cortex where the effects of aging have been linked to other mechanisms such as a reduction in the dendritic arborization and spine density of neurons, lower synaptic density, or an increase in the action potential firing rate due to neuronal activity (see Brennan et al., 2009 for a review).

What mechanisms target serine racemase expression in the hippocampus of the aging brain? We show here that deficits in serine racemase expression occur at the mRNA and protein levels, indicating that both transcriptional and posttranscriptional changes may be involved. Brain aging is characterized by an imbalance between antioxidant defenses and the intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS), leading to an exacerbation of DNA and protein oxidation (Sohal and Weindruch, 1996; Verbitsky et al., 2004; Droge and Schipper, 2007). Growing evidence indicates that this oxidative stress underlies age-related memory impairments (Forster et al., 1996; McGahon et al., 1999; Fukui et al., 2001; Liu et al., 2003; Pieta Dias et al., 2007). Interestingly, it has been shown that serine racemase activity is inhibited by nitric oxide-mediated S-nitrosylation (Mustafa et al., 2007) and by sulfhydryl oxidation (Wolosker et al., 1999). In this context, it is worth noting that Lou/C/Jall rats,

which do not exhibit age-related changes in serine racemase expression, display reduced oxidative metabolism and ROS production (Garait et al., 2005). Targeting the serine racemase gene may therefore represent a specific and potent mechanism by which ROS disrupt hippocampus-related cognitive abilities in aging.

Conflict of interest

The authors have no current or potential conflicts of interest to report.

Acknowledgments

We thank J. Bouvier for technical assistance, and A. Cougnon and D. Bergerot for their care of the animals. This manuscript was prepared with editorial help from Gap Junction (www.gap-junction.com).

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Scientifique (INSERM), and funding from the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM to SHRO), the Agence National pour la Recherche (to SHRO), NARSAD (to SHRO) and the Institut de la Longévité et du Vieillessement (GIS Vieillessement).

References

- Adams, M.M., Smith, T.D., Moga, D., Gallagher, M., Wang, Y., Wolfe, B.B., Rapp, P.R., Morrison, J.H., 2001. Hippocampal dependent learning ability correlates with *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor levels in CA3 neurons of young and aged rats. *J. Comp. Neurol.* 432, 230–243.
- Alliot, J., Boghossian, S., Jourdan, D., Veyrat-Durebex, C., Pickering, G., Meynial-Denis, D., Gaumet, N., 2002. The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 57, B312–320.
- Aura, J., Riekkinen, M., Riekkinen Jr., P., 1998. Tetrahydroaminoacridine and D-cycloserine stimulate acquisition of water maze spatial navigation in aged rats. *Eur. J. Pharmacol.* 342, 15–20.
- Aura, J., Riekkinen Jr., P., 2000. Pre-training blocks the improving effect of tetrahydroaminoacridine and D-cycloserine on spatial navigation performance in aged rats. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 313–318.
- Barnes, C.A., 1985. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav. Neurosci.* 99, 1040–1048.
- Barnes, C.A., 1995. Involvement of LTP in memory: are we “searching under the street light”? *Neuron* 15, 751–754.
- Barnes, C.A., Rao, G., Shen, J., 1997. Age-related decrease in the *N*-methyl-D-aspartateR-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol. Aging* 18, 445–452.
- 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.
- Baxter, M.G., Lanthorn, T.H., Frick, K.M., Golski, S., Wan, R.Q., Olton, D.S., 1994. D-cycloserine, a novel cognitive enhancer, improves spatial memory in aged rats. *Neurobiol. Aging* 15, 207–213.

- Billard, J.-M., 2006. Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. *Magnes. Res.* 19, 199–215.
- Billard, J.-M., 2008. D-serine signalling as a prominent determinant of neuronal-glial dialogue in the healthy and diseased brain. *J. Cell Mol. Med.* 12, 1872–1884.
- Bimonte, H.A., Nelson, M.E., Granholm, A.C., 2003. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol. Aging* 24, 37–48.
- Brennan, A.R., Yuan, P., Dickstein, D.L., Rocher, A.B., Hof, P.R., Manji, H., Arnsten, A.F., 2009. Protein kinase C activity is associated with prefrontal cortical decline in aging. *Neurobiol. Aging* 30, 782–792.
- Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M., Abderrahim, H., Bougueleret, L., Barry, C., Tanaka, H., La Rosa, P., Puech, A., Tahri, N., Cohen-Akenine, A., Delabrosse, S., Lissarrague, S., Picard, F.P., Maurice, K., Essioux, L., Millasseau, P., Grel, P., Debailleul, V., Simon, A.M., Caterina, D., Dufaure, I., Malekzadeh, K., Belova, M., Luan, J.J., Bouillot, M., Sambucy, J.L., Primas, G., Saumier, M., Boubkiri, N., Martin-Saumier, S., Nasroune, M., Peixoto, H., Delaye, A., Pinchot, V., Bastucci, M., Guillou, S., Chevillon, M., Sainz-Fuertes, R., Meguenni, S., Aurich-Costa, J., Cherif, D., Gimalac, A., Van Duijn, C., Gauvreau, D., Ouellette, G., Fortier, I., Raelson, J., Sherbatch, T., Riazanskaia, N., Rogaev, E., Raeymaekers, P., Aerssens, J., Konings, F., Luyten, W., Macciardi, F., Sham, P.C., Straub, R.E., Weinberger, D.R., Cohen, N., Cohen, D., 2002. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13675–13680.
- Clayton, D.A., Mesches, M.H., Alvarez, E., Bickford, P.C., Browning, M.D., 2002. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* 22, 3628–3637.
- Droge, W., Schipper, H.M., 2007. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 6, 361–370.
- Dun, Y., Duplantier, J., Roon, P., Martin, P.M., Ganapathy, V., Smith, S.B., 2008. Serine racemase expression and D-serine content are developmentally regulated in neuronal ganglion cells of the retina. *J. Neurochem.* 104, 970–978.
- Dyall, S.C., Michael, G.J., Whelpton, R., Scott, A.G., Michael-Titus, A.T., 2007. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol. Aging* 28, 424–439.
- Eckles-Smith, K., Clayton, D., Bickford, P., Browning, M.D., 2000. Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78, 154–162.
- Eichenbaum, H., 1996. Learning from LTP: a comment on recent attempts to identify cellular and molecular mechanisms of memory. *Learn. Mem.* 3, 61–73.
- Forster, M.J., Dubey, A., Dawson, K.M., Stutts, W.A., Lal, H., Sohal, R.S., 1996. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4765–4769.
- Foster, T.C., 2007. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6, 319–325.
- Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., Urano, S., 2001. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 928, 168–175.
- Gant, J.C., Sama, M.M., Landfield, P.W., Thibault, O., 2006. Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J. Neurosci.* 26, 3482–3490.
- Garait, B., Couturier, K., Servais, S., Letexier, D., Perrin, D., Batandier, C., Rouanet, J.L., Sibille, B., Rey, B., Leverage, X., Favier, R., 2005. Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H(2)O(2) production. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1249–1261.
- Horiike, K., Tojo, H., Arai, R., Nozaki, M., Maeda, T., 1994. D-amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: regional differentiation of astrocytes. *Brain Res.* 652, 297–303.
- Izquierdo, I., 1991. Role of NMDA receptors in memory. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 128–129.
- Junjaud, G., Rouaud, E., Turpin, F., Mothet, J.-P., Billard, J.-M., 2006. Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat. *J. Neurochem.* 98, 1159–1166.
- Kollen, M., Stephan, A., Faivre-Bauman, A., Loudes, C., Sinet, P.-M., Alliot, J., Billard, J.-M., Epelbaum, J., Dutar, P., Jouvenceau, A., 2008. Preserved memory capacities in aged Lou/C/Jall rats. *Neurobiol. Aging*, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.010.
- Kumar, A., Foster, T.C., 2005. Intracellular calcium stores contribute to increased susceptibility to LTD induction during aging. *Brain Res.* 1031, 125–128.
- Landfield, P.W., Lynch, G., 1977. Impaired monosynaptic potentiation in *in vitro* hippocampal slices from aged, memory-deficient rats. *J. Gerontol.* 32, 523–533.
- Landfield, P.W., Pitler, T.A., Applegate, M.D., 1986. The effects of high Mg²⁺-to-Ca²⁺ ratios on frequency potentiation in hippocampal slices of young and aged rats. *J. Neurophysiol.* 56, 797–811.
- Lisman, J.E., McIntyre, C.C., 2001. Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr. Biol.* 11, R788–791.
- Liu, R., Liu, I.Y., Bi, X., Thompson, R.F., Doctrow, S.R., Malfroy, B., Baudry, M., 2003. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8526–8531.
- Lynch, G., 1998. Memory and the brain: unexpected chemistries and a new pharmacology. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 82–100.
- Magnusson, K.R., Nelson, S.E., Young, A.B., 2002. Age-related changes in the brain expression of subunits of the NMDA receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 99, 40–45.
- Makris, N., Papadimitriou, G.M., van der Kouwe, A., Kennedy, D.N., Hodge, S.M., Dale, A.M., Benner, T., Wald, L.L., Wu, O., Tuch, D.S., Caviness, V.S., Moore, T.L., Killiany, R.J., Moss, M.B., Rosene, D.L., 2007. Frontal connections and cognitive changes in normal aging rhesus monkeys: a DTI study. *Neurobiol. Aging* 28, 1556–1567.
- Martineau, M., Baux, G., Mothet, J.-P., 2006. D-serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci.* 29, 481–491.
- McGahon, B.M., Martin, D.S., Horrobin, D.F., Lynch, M.A., 1999. Age-related changes in LTP and antioxidant defenses are reversed by an alpha-lipoic acid-enriched diet. *Neurobiol. Aging* 20, 655–664.
- Miya, K., Inoue, R., Takata, Y., Abe, M., Natsume, R., Sakimura, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H., 2008. Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 510, 641–654.
- Moore, T.L., Killiany, R.J., Herndon, J.G., Rosene, D.L., Moss, M.B., 2003. Impairment in abstraction and set shifting in aged rhesus monkeys. *Neurobiol. Aging* 24, 125–134.
- Mothet, J.-P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady Jr., 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.
- Mothet, J.-P., Rouaud, E., Sinet, P.-M., Potier, B., Jouvenceau, A., Dutar, P., Videau, C., Epelbaum, J., Billard, J.-M., 2006. A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5, 267–274.
- Mustafa, A.K., Kumar, M., Selvakumar, B., Ho, G.P., Ehmsen, J.T., Barrow, R.K., Amzel, L.M., Snyder, S.H., 2007. Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2950–2955.
- Nielsen-Bohlman, L., Knight, R.T., 1995. Prefrontal alterations during memory processing in aging. *Cereb. Cortex* 5, 541–549.
- Oliet, S.H., Mothet, J.-P., 2006. Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function. *Glia* 54, 726–737.
- Ossowska, K., Wolfarth, S., Schulze, G., Wardas, J., Pietraszek, M., Lorenc-Koci, E., Smialowska, M., Coper, H., 2001. Decline in motor functions in aging is related to the loss of NMDA receptors. *Brain Res.* 907, 71–83.

- 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.
- Pieta Dias, C., Martins de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V.A., Siciliani Scalco, F., Rewsaat Guimaraes, M., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schroder, N., 2007. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 146, 1719–1725.
- Potier, B., Poindessous-Jazat, F., Dutar, P., Billard, J.-M., 2000. NMDA receptor activation in the aged rat hippocampus. *Exp. Gerontol.* 35, 1185–1199.
- Puyal, J., Devau, G., Venteo, S., Sans, N., Raymond, J., 2002. Calcium-binding proteins map the postnatal development of rat vestibular nuclei and their vestibular and cerebellar projections. *J. Comp. Neurol.* 451, 374–391.
- Raz, N., Gunning, F.M., Head, D., Dupuis, J.H., McQuain, J., Briggs, S.D., Loken, W.J., Thornton, A.E., Acker, J.D., 1997. Selective aging of the human cerebral cortex observed in vivo: differential vulnerability of the prefrontal gray matter. *Cereb. Cortex* 7, 268–282.
- Rypma, B., D'Esposito, M., 2000. Isolating the neural mechanisms of age-related changes in human working memory. *Nat. Neurosci.* 3, 509–515.
- Schell, M.J., Brady Jr., R.O., Molliver, M.E., Snyder, S.H., 1997. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J. Neurosci.* 17, 1604–1615.
- Schell, M.J., Molliver, M.E., Snyder, S.H., 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3948–3952.
- Shankar, S., Teyler, T.J., Robbins, N., 1998. Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. *J. Neurophysiol.* 79, 334–341.
- Shleper, M., Kartvelishvily, E., Wolosker, H., 2005. D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J. Neurosci.* 25, 9413–9417.
- Sohal, R.S., Weindruch, R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59–63.
- Sykova, E., Mazel, T., Hasenohrl, R.U., Harvey, A.R., Simonova, Z., Mulders, W.H., Huston, J.P., 2002. Learning deficits in aged rats related to decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus. *Hippocampus* 12, 269–279.
- Thibault, O., Gant, J.C., Landfield, P.W., 2007. Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 6, 307–317.
- Thompson, L.T., Disterhoft, J.F., 1997. Age- and dose-dependent facilitation of associative eyeblink conditioning by D-cycloserine in rabbits. *Behav. Neurosci.* 111, 1303–1312.
- Thompson, L.T., Moskal, J.R., Disterhoft, J.F., 1992. Hippocampus-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. *Nature* 359, 638–641.
- Urai, Y., Jinnouchi, O., Kwak, K.T., Suzue, A., Nagahiro, S., Fukui, K., 2002. Gene expression of D-amino acid oxidase in cultured rat astrocytes: regional and cell type specific expression. *Neurosci. Lett.* 324, 101–104.
- Verbitsky, M., Yonan, A.L., Malleret, G., Kandel, E.R., Gilliam, T.C., Pavlidis, P., 2004. Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice. *Learn. Mem.* 11, 253–260.
- Wolosker, H., 2007. NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. *Mol. Neurobiol.* 36, 152–164.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S.H., 1999. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13409–13414.
- Wyss, J.M., Chambless, B.D., Kadish, I., van Groen, T., 2000. Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiol. Aging* 21, 671–681.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S., 2003. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15194–15199.
- Yasuda, E., Ma, N., Semba, R., 2001. Immunohistochemical evidences for localization and production of D-serine in some neurons in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 299, 162–164.



Contribution of the D-Serine-dependent pathway to the cellular mechanisms underlying cognitive aging

B. Potier¹, F. R. Turpin^{1†}, P.-M. Sinet¹, E. Rouaud¹, J.-P. Mothet^{2†}, C. Videau¹, J. Epelbaum¹, P. Dutar¹ and J.-M. Billard^{1*}

¹ Centre de Psychiatrie et Neurosciences, INSERM, U894, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France

² Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS UPR 9040, Gif sur Yvette, France

Edited by:

Thomas C. Foster, University of Florida, USA

Reviewed by:

Jose M. Delgado-Garcia, University Pablo de Olavide, Spain

Michael R. Foy, Loyola Marymount University, USA

Michelle Nicolle, Wake Forest University School of Medicine, USA

*Correspondence:

J.-M. Billard, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, INSERM, U894, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, 2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France. e-mail: jean-marie.billard@inserm.fr

†Present address:

F. R. Turpin and J.-P. Mothet, INSERM U862, Neurocentre Magendie, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux 33077, France.

An association between age-related memory impairments and changes in functional plasticity in the aging brain has been under intense study within the last decade. In this article, we show that an impaired activation of the strychnine-insensitive glycine site of *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-R) by its agonist D-serine contributes to deficits of synaptic plasticity in the hippocampus of memory-impaired aged rats. Supplementation with exogenous D-serine prevents the age-related deficits of isolated NMDA-R-dependent synaptic potentials as well as those of theta-burst-induced long-term potentiation and synaptic depotentiation. Endogenous levels of D-serine are reduced in the hippocampus with aging, that correlates with a weaker expression of serine racemase synthesizing the amino acid. On the contrary, the affinity of D-serine binding to NMDA-R is not affected by aging. These results point to a critical role for the D-serine-dependent pathway in the functional alterations of the brain underlying memory impairment and provide key information in the search for new therapeutic strategies for the treatment of memory deficits in the elderly.

Keywords: memory, serine racemase, NMDA receptors, hippocampus, synaptic plasticity

INTRODUCTION

In the general decline that gradually develops with age, learning and memory deficits are frequent features. Studies in animal models of aging have confirmed the occurrence of cognitive decline with age and shown that it concerns several forms of memory, including spatial, associative and long-term memory (Winocur and Moscovitch, 1990; Gallagher and Rapp, 1997; Miyamoto, 1997; Houston et al., 1999; Norris and Foster, 1999; Clayton et al., 2002a; Sykova et al., 2002; Rosenzweig and Barnes, 2003; Gruart et al., 2008). These studies emphasize the role of the hippocampus and related structures in age-related memory deficits, demonstrating that the functional properties of hippocampal networks are particularly vulnerable to aging (Landfield, 1988; Foster and Norris, 1997; Thibault et al., 2007). In particular, the study of long-lasting modifications of glutamatergic neurotransmission such as long-term potentiation (LTP), long-term depression and LTP reversal (depotentialization), now considered to be the functional substrates of memory encoding (Izquierdo and Medina, 1995; Kim and Linden, 2007), have demonstrated changes in the threshold and/or magnitude of synaptic plasticity with age (Foster, 1999; Barnes, 2003). Although several mechanisms may account for these changes (Rosenzweig and Barnes, 2003; Foster, 2007), most of these studies have focused on the activation of the *N*-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors (*N*-methyl-D-aspartate receptors, NMDA-R). Indeed, these receptors play a major role in regulating synaptic strength, by means of their high permeability to Ca²⁺, which triggers the activation of specific protein kinases and phosphatases (Wang et al., 1997). Although evidence indicates that NMDA-R activation is

impaired in aged rodents (Barnes et al., 1997; Potier et al., 2000), the mechanisms that significantly contribute to this alteration have yet to be definitely identified and it remains to be determined whether it is really involved in age-related deficits in synaptic plasticity.

In addition to glutamate, NMDA-R activation requires the binding of a co-agonist at the strychnine-insensitive glycine site (Johnson and Ascher, 1990). Recent developments indicate that the amino acid D-serine, rather than glycine itself, is the main endogenous co-agonist of NMDA-R in cerebral areas involved in memory processes, and in the hippocampus in particular (Mothet et al., 2000). Moreover, it has been shown that the induction of LTP both in hippocampal cultures and in slice preparations is blocked when D-serine is absent from the extracellular space (Yang et al., 2003; Mothet et al., 2006). These results suggest a possible contribution of D-serine to the impairment of NMDA-R activation and functional plasticity that takes place in the aging brain, and consequently a role for the amino acid in age-related memory defects.

In this report, we present our recent experimental results indicating that the manipulation of D-serine levels at the synapse may be an alternative strategy for the development of new treatments for cognitive aging.

MATERIALS AND METHODS

ANIMAL PROTOCOLS

All animal experiments were performed in strict compliance with the European Communities Council Directive (86/809/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures and

approved by the local ethics committee. Experiments were conducted on “adult” (3–6 months old, $n = 58$) and “aged” (25–33 months old, $n = 57$) male Sprague-Dawley rats purchased from IFFA-CREDO (France). Rats were maintained on a 12 h controlled light–dark cycle at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with *ad libitum* access to food and water.

BEHAVIORAL TESTS

The task was a modified version of the Morris water maze (Morris et al., 1982). Each rat was first trained to swim to a visible platform (13 cm \times 13 cm) placed in a fixed position in one of the quadrants of a circular pool (150 cm in diameter), painted black and filled with water at $21\text{--}22^\circ\text{C}$. The platform was 2 cm above the surface of the water, and could easily be seen by the rats. The time (escape latency) and distance swum before finding the platform were then determined. If the rat did not find the platform within 60 s, it was placed on the platform and left for 35 s. Four trials per day were carried out for 6 days. A different (randomly determined) starting location was used for each trial. Visual cues were present around the pool.

During the second phase of testing (place version), the rat was trained to swim to an invisible platform that was located at a position different from that used during the visible platform trial. The platform was located 2 cm below the surface of the water. Four trials per day were carried out for 6 days. The position of the platform remained the same for the 6 days of the test. For each trial, the time and distance to platform and swim speed were measured using Smart_c software. On day 7 (probe trial), the hidden platform was removed and the time spent by the rat swimming through the different quadrants, including the quadrant in which the platform was situated during place learning, was registered over a 90-s period.

ELECTROPHYSIOLOGY

Transverse hippocampal slices (400 μm) were obtained from rats anesthetized with halothane before decapitation. Slices were prepared in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) and placed in a holding chamber for at least 1 h. The composition of aCSF was (in mM): NaCl 124, KCl 3.5, MgSO_4 1.5, CaCl_2 2.3, NaHCO_3 26.2, NaH_2PO_4 1.2, and glucose 11. A single slice at a time was transferred to the recording chamber and continuously superfused with aCSF pre-gassed with 95% O_2 /5% CO_2 .

Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were obtained at room temperature from the apical dendritic layer of the CA1 area after electrical stimulation (100 μs duration) of Schaffer collaterals and commissural fibers. Input/Output (I/O) curves of NMDA-R-mediated synaptic responses were plotted for adult and aged rats from slices superfused for 40 min in low Mg^{2+} aCSF supplemented with the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/kainate receptor antagonist 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzoquinoline-7-sulfonamide (NBQX, 10 μM). A knife cut was introduced to separate CA3 and CA1 in order to prevent the propagation of epileptiform discharges. The slope of three averaged fEPSPs was measured and plotted against different intensities of stimulation (from 0 to 500 μA) using Acquis 1 software (CNRS, Paris, France).

For experiments investigating LTP, two different conditioning stimuli were delivered after a baseline acquisition of 15 min. In the case of high frequency stimulation (HFS), the stimulus consisted of

two trains (100 Hz for 1 s) separated by a 20-s interval. In the case of theta-burst stimulation (TBS), it consisted of five trains of four pulses at 100 Hz separated by 200 ms. This sequence was repeated three times with an interval of 10 s. In both HFS and TBS experiments, testing with a single pulse was then resumed for 60 min to determine the level of stable LTP.

In order to investigate the depotentiation of synaptic transmission, a low frequency conditioning stimulus (LFS, 900 pulses, 1 Hz) was applied 1 h after HFS delivery. Tests with a single pulse were resumed for at least 40 min after LFS. To study the effects of exogenous D-serine, the co-agonist was applied throughout the recording except for the depotentiation paradigm where it was applied 50 min after HFS delivery, once LTP was stabilized. The co-agonist was then maintained until the end of the recording.

AUTORADIOGRAPHY

[^3H] L-689.560 (22.41 Ci/mmol or 0.83 TBq/mmol) was obtained from Tocris Cookson, Bristol (UK). The brain of adult and aged rats were quickly removed, frozen for 30 s in isopentane at -40°C and stored at -80°C . Coronal sections (14 μm) were cut on a cryostat at -15°C and mounted onto glass slides. Brain sections were preincubated with 50 mM Tris acetate buffer (pH 7.0) at room temperature for 30 min to remove endogenous free D-serine. For competition studies, sections were incubated with Tris acetate buffer supplemented with 10 μM strychnine and 1 nM [^3H] L-689.560 containing D-serine, glycine and L-689.560 at 4°C for 120 min. After incubation, the slides were rinsed four times with cold Tris acetate buffer (4°C) for a total of 20 s and then in distilled water at the same temperature for 5 s. After drying, slides were placed on [^3H]-sensitive film (Hyperfilm- ^3H , Amersham) for two months at 4°C . The film was developed with Dektol (Kodak) for 2 min and analyzed using an X-ray film digitizer, RAG500, and Biocom software (Les Ulis, France).

DETERMINATION OF D-SERINE CONTENT IN HIPPOCAMPAL SLICES

Free amino acids were extracted from pooled brain slices with trichloroacetic acid and stored at -80°C until assay. Two different procedures were used to determine D-serine content. The first technique quantified D-serine using a chemiluminescent assay based on the DAAO/HRP/luminol system (Wolosker et al., 1999). In the second approach, high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed using pre-column derivatization of samples with O-phthalaldehyde and N-acetyl cysteine. Dia-stereo-isomers were resolved in the isocratic phase on a C18 Nova Pak column. In both procedures, the amount of D-serine was adjusted to protein content as determined by a Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Standards of D-serine were used to normalize the results.

SEMI-QUANTITATIVE IMMUNOBLOT ANALYSIS

Western blot analysis was performed as described previously (Puyal et al., 2002). Briefly, after lysis, protein extracts were subjected to electrophoresis (12% SDS-polyacrylamide gel) and electroblotted onto PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore). Membranes were probed with a polyclonal antibody to DAAO (1:2000, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands), a polyclonal antibody to serine racemase (1:200, Santa Cruz Biotechnology,

Wiltshire, UK) or a monoclonal α -Tubulin antibody (1:400, Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. After washing, they were incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-goat and anti-mouse immunoglobulin G respectively (IgG; 1:2000, Vector Laboratories Burlingame, USA). Immunoblots were developed using enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Molecular sizes were estimated by separating prestained molecular weight markers (6.5–175 kDa) in parallel (New England BioLabs, Hertfordshire, UK). Protein bands of interest were analyzed by measuring optical density using scanning densitometry. Densitometric results for serine racemase and DAAO were normalized to the density of α -Tubulin. Each blot included three successive dilutions of samples for the quantification of variations in density.

QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Total RNA was prepared from frozen tissues using the RNeasy Midi kit (Qiagen). Total RNA was converted to cDNA using M-MLV reverse transcriptase and random hexanucleotide primers designed using PrimerExpress (Applied Biosystems), as follows. Serine racemase: (sense: 5'-GATTCGAGGTGCCCTTAACG-3'; antisense: 5'-TTGGGCTTCCCTTCTAAAGTATCA-3'), D-amino acid oxidase (sense: 5'-CCTCAGGTCCGCTAGAAAGA-3'; antisense: 5'-GGATGACCTCTGCACTTGAAGAT-3'), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (sense: 5'-TGACCGCTTTGCTAGCTACATC-3'; antisense: 5'-GCGCCTTGTTTGTCTGTTTC-3') and MAP2 (sense: 5'-AGATCAGAAAGACTGGTTCATCGA-3'; antisense: 5'-CAGCTAAACCCCATTCATCCTT-3'). PCR reactions (20 μ l total volume) were performed with Sybr Green PCR master mix using standard protocols on an ABI 7000 Sequence Detection System. Raw Ct values were obtained with SDS 2.0 and were used for relative expression calculations.

DRUGS

All drugs were applied in aCSF and included NBQX (10 μ M in DMSO), D-2-amino-5-phosphonovalerate (D-APV, 30–80 μ M), D-serine (2–200 μ M), L-serine (100 μ M), L689,560 (10 μ M) and nifedipine (50 μ M). Drugs were purchased from Tocris (Illkirch, France).

STATISTICS

All results are expressed as means \pm SEM. Behavioral results and time-course of synaptic plasticity were analyzed by one or two-ways analyses of variance (ANOVA) with repeated measures, followed by *post hoc* multiple comparisons tests (Fisher's PLSD) (Statview[®]). The sensitivity of NMDA-R-mediated fEPSPs to exogenous D-serine was determined using Student's paired *t*-test while the effects of age on other parameters (magnitude of LTP over the last 15 min of recordings, expression of proteins involved in the D-serine pathway, D-serine levels) were analyzed using an unpaired *t*-test. In all cases, differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Spatial learning was explored in adults ($n = 10$) and aged animals ($n = 12$) using different versions of the Morris water maze protocol. As illustrated in **Figure 1A** (left), the distance swum to find the platform differed greatly between groups ($p < 0.0001$) and a significant

interaction between group and time was observed, since aged rats swam longer distances before reaching the hidden platform in the "place" version of the task (interaction of distance \times group/age, $p < 0.01$). When each group was examined separately, adult rats efficiently learned the position of the platform across trials, as demonstrated by a significant decrease in the distance swum before finding the platform in each subsequent trial ($p < 0.005$), whereas aged rats did not ($p = 0.3$). When animals were tested 24 h after the end of the learning sessions, adult rats spent more time swimming in the quadrant in which the platform was located during place learning, whereas aged ones did not (**Figure 1A**, right). In contrast, the two groups of animals did not differ in swim speed during place learning (15.3 ± 0.9 cm/s in adults vs. 12.4 ± 1.1 cm/s in aged animals) and in distance swum or time to escape onto a visible platform in the cued version of the maze (not shown). These results indicate that aged rats are significantly impaired with respect to spatial learning and that these deficits are independent of sensory and/or motor dysfunctions.

AGE-RELATED CHANGES IN SYNAPTIC PLASTICITY

Since spatial learning has been associated with the capacity of hippocampal neuronal networks to adapt synaptic strength to ongoing changes in presynaptic activity (Izquierdo and Medina, 1995; Lynch, 2004; Kim and Linden, 2007), we compared the induction and expression of synaptic plasticity in hippocampal slices from adults and aged rats, including high-frequency (HFS) and theta-burst (TBS)-patterns to study LTP, and HFS followed 1 h later by low frequency stimulation (LFS) to evaluate depotentiation (see Materials and Methods).

Following the HFS protocol, recordings in slices from adult rats ($n = 20$) showed a long-term increase in synaptic transmission (**Figure 1B**, left) of $48.7 \pm 5.4\%$, averaged from the last 15 min of recordings (**Figure 1B**, right). LTP generated in slices from aged rats ($n = 13$) had a magnitude ($50.4 \pm 8.7\%$) similar to that recorded in adults (**Figure 1B**, right). However, it is worth noting that the fEPSPs amplitude rapidly returned to baseline levels in slices from adult rats ($n = 10$) when HFS was delivered in the presence of the NMDA-R antagonist D-APV (80 μ M), whereas a long lasting potentiation still remained under the same conditions in slices from aged animals ($17.1 \pm 4.9\%$, $n = 10$ when averaged from the last 15 min of recordings). HFS-induced LTP was prevented in aged rats only when the conditioning stimulus was delivered in the presence of D-APV and of the voltage-gated calcium channel (VGCC) blocker nifedipine (50 μ M) (**Figure S1** in Supplementary Material).

Under control conditions, a low frequency stimulus (1 Hz, 15 min) delivered 1 h after HFS induced an LTP reversal or depotentiation in slices from adult animals ($n = 9$) but had little effect on slices from aged rats ($n = 19$) (**Figure 1C**, left). Indeed, the percent reversal calculated from the last 15 min of recordings averaged $32.3 \pm 2.7\%$ in the former and only $10.7 \pm 2.3\%$ in the latter, indicating that LTP reversal was affected by age (**Figure 1C**, right).

In the theta-burst paradigm of stimulation (TBS), synaptic transmission was potentiated in slices from adult rats ($n = 12$) (**Figure 1D**, left), resulting in a $35.4 \pm 2.4\%$ increase in amplitude. TBS-induced LTP was also recorded in slices from old animals ($n = 13$) (**Figure 1D**, left) but the percent increase ($19.4 \pm 4.7\%$) was significantly lower than that reached in adult rats ($p = 0.02$) (**Figure 1D**, right). Contrary to our results with HFS-induced LTP, the long-lasting increase in

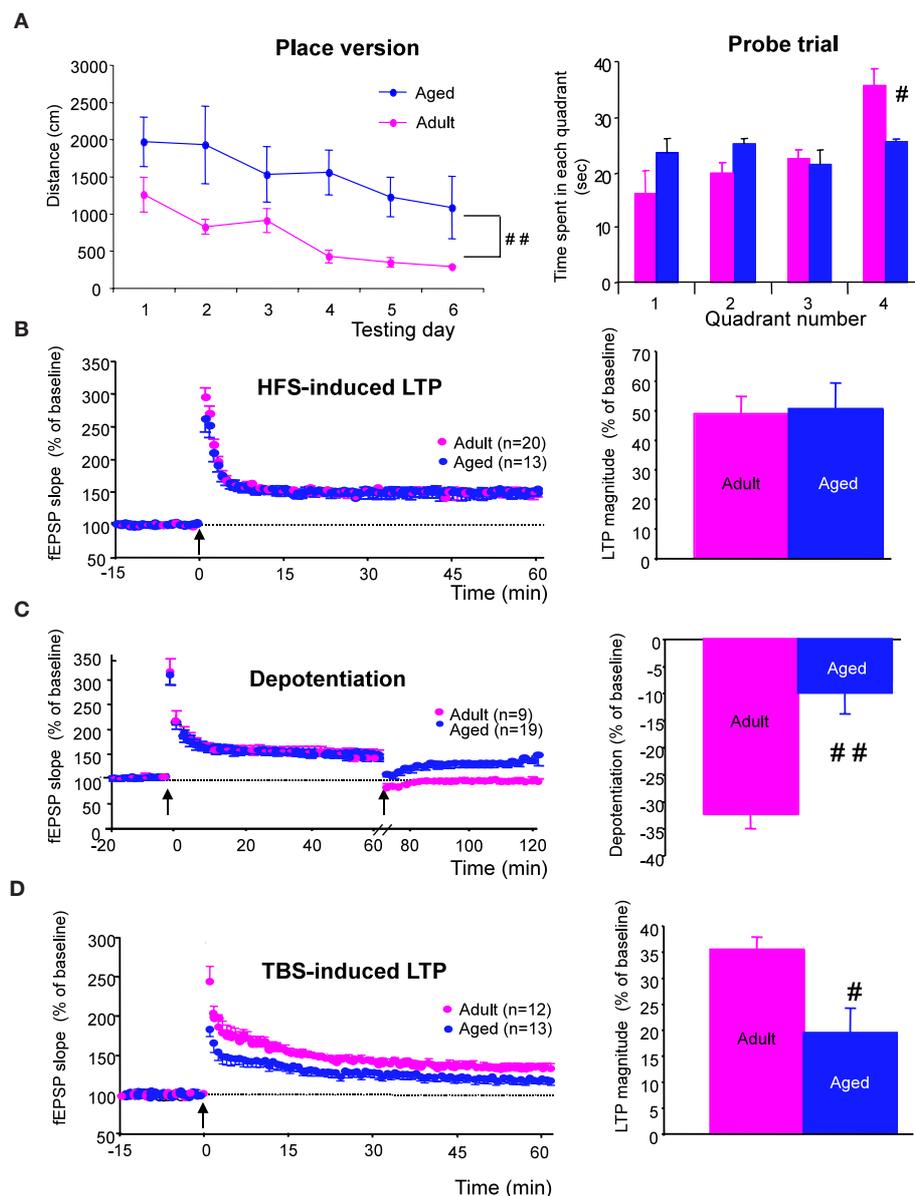


FIGURE 1 | Spatial learning and hippocampal synaptic plasticity are impaired in aged rats. (A, left) Comparison of the distance swum before escaping onto the hidden platform over 6 days of training in adult and aged rats (## $p < 0.01$, repeated measures ANOVA). **(A, right)** Comparison of time spent by rats swimming through the different quadrants, including quadrant 4, where the platform was situated during place learning, registered over a 90-s probe trial (# $p < 0.05$, unpaired t -test). **(B, left)** Time-course of LTP

induction in adult and aged rats by HFS (arrow). **(B, right)** Comparison of mean LTP magnitude (\pm SEM) calculated for the last 15 min of recording. **(C, left)** Time course of depotentiation of previously HFS-potentiated synaptic responses induced in adult and aged rats by LFS. **(C, right)** Comparison of depotentiation magnitude (\pm SEM) calculated for the last 15 min of recording. **(D)** Illustration of results obtained with TBS protocols. (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, unpaired t -test).

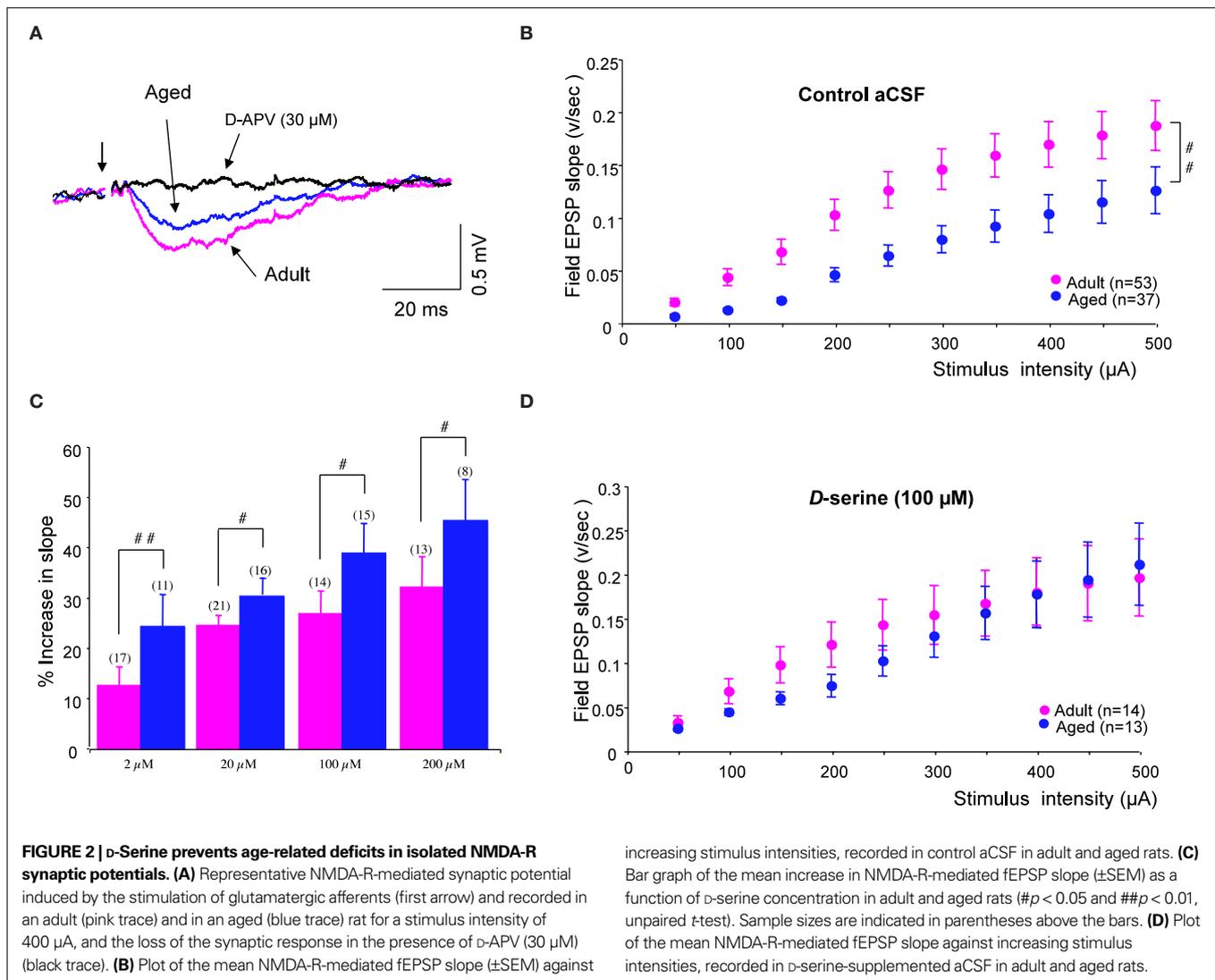
synaptic transmission induced by TBS was totally blocked both in adult ($n = 6$) and aged rats ($n = 7$) when the conditioning stimulus was delivered in the presence of D-APV ($80 \mu\text{M}$).

AGE-RELATED CHANGES IN ISOLATED NMDA-R-MEDIATED SYNAPTIC RESPONSES: EFFECTS OF D-SERINE

Except for the HFS-induced LTP in aged rats in which VGCC were also concerned, the specific antagonist D-APV alone was able to prevent the expression of synaptic plasticity in both groups of

animals, confirming the pivotal role of NMDA-R in this process. We therefore subsequently looked for changes in the behavior of isolated NMDA-R-mediated synaptic potentials that could account for these age-related changes in synaptic plasticity.

Synaptic potentials were recorded in low- Mg^{2+} medium supplemented with the AMPA receptor antagonist NBQX ($10 \mu\text{M}$), and were blocked by D-APV ($30 \mu\text{M}$) added at the end of the recordings (**Figure 2A**). I/O curves plotted for data collected using 53 slices from 24 adult rats and 37 slices from 19 aged



animals at multiple stimulus intensities (Figure 2B) indicated that the amplitude of these NMDA-R synaptic potentials was significantly reduced in aged rats (interaction of strain \times intensity, $p = 0.01$).

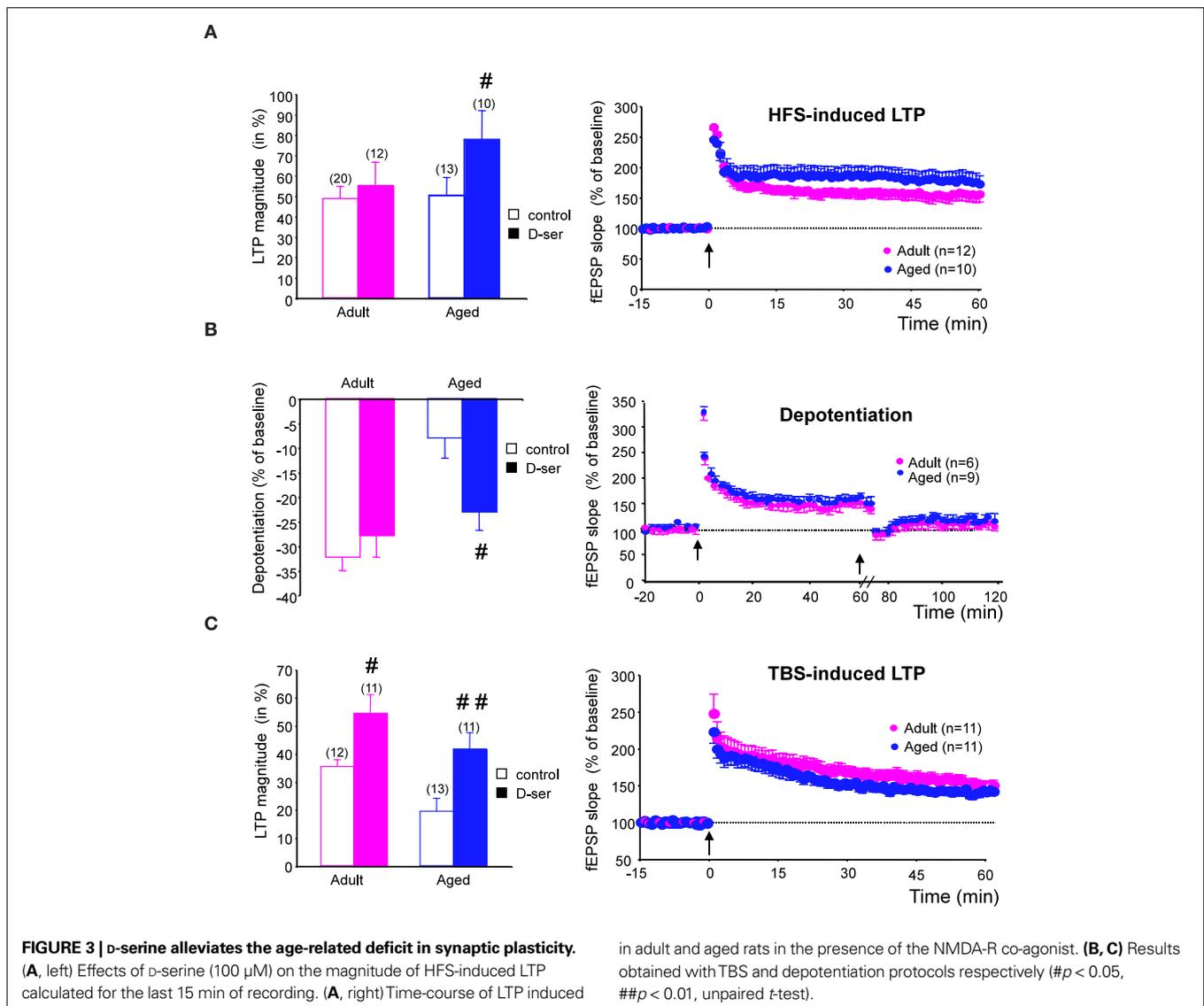
Because NMDA-R synaptic potentials were also antagonized by L689,560 (10 μ M), the specific blocker of the glycine modulatory site, we wondered whether changes affecting this binding site could underlie the age-related decrease in NMDA-R activation. We therefore checked the responsiveness of isolated NMDA-R-mediated synaptic potentials to an exogenous application of the specific agonist D-serine. As illustrated in Figure 2C, the amino acid dose-dependently enhanced these synaptic responses, but its potency was significantly higher in slices from aged rats than in those from young adults, regardless of the concentration of the co-agonist. Consequently, deficits in NMDA-R synaptic potentials were prevented in slices from aged animals supplied with D-serine (see Figure 2D). In contrast, L-serine (100 μ M), the precursor of D-serine, did not significantly alter isolated NMDA-R synaptic potentials either in slices from adults ($n = 10$) or from old rats ($n = 9$).

EFFECTS OF D-SERINE ON AGE-RELATED DEFICITS IN SYNAPTIC PLASTICITY

Since isolated NMDA-R potentials were rescued from age-related alterations by boosting the activation of the glycine modulatory site, we asked whether deficits in the expression of synaptic plasticity in aged rats could also be reversed by the same procedure.

In slices from adults ($n = 12$), D-serine did not affect the magnitude of HFS-induced LTP, whereas it significantly increased the amplitude of potentiation in slices ($n = 10$) from old animals ($p < 0.05$, Figure 3A, left). Under these conditions, in which the agonist saturated the glycine binding sites of the NMDA-R, HFS-induced LTP was higher in aged rats ($77.8 \pm 13.9\%$) than in younger ones ($55 \pm 11.6\%$) (Figure 3A, right), although this difference was not statistically relevant.

The effects of exogenous D-serine on depotentiation were then investigated. When the NMDA-R co-agonist was present in the aCSF during LFS delivery, the magnitude of depotentiation in slices from aged rats ($n = 9$) was significantly enhanced ($p < 0.05$), whereas no effect was seen in slices from adult rats ($n = 6$) (Figure 3B, left). Under these conditions, the age-related alteration of depotentiation was therefore prevented by D-serine (Figure 3B, right).



Regarding the effects of by D-serine on TBS-induced LTP, the magnitude averaged over the last 15 min of recording was significantly increased in slices from both young adult ($n = 11$) and aged ($n = 11$) animals, but the increase was greater in the latter group (Figure 3A, left). Consequently, the age-related deficit in TBS-induced LTP was alleviated by the exogenous application of the NMDA-R co-agonist (Figure 3C, right).

D-SERINE-DEPENDENT METABOLIC PATHWAYS IN AGING

The impaired activation of the NMDA-R glycine modulatory site by endogenous D-serine during aging may be due to changes in receptor affinity and/or the availability of the co-agonist in aged hippocampal tissues.

D-serine binding sites were abundantly present in the *stratum radiatum* and *stratum oriens* of the CA1 hippocampal region as well as in the dentate gyrus of both adult ($n = 3$) and aged ($n = 3$) animals, as revealed by the potent radioligand [3 H] L689.560. This

ligand was dose-dependently displaced by unlabeled D-serine (from 3 nM to 300 μ M) to a similar extent in the two groups of animals and in all hippocampal subregions (Figures 4A–C), indicating that the affinity of the NMDA-R glycine binding site for D-serine was not altered by age.

To determine whether aging alters the availability of the endogenous ligand, two different methods were applied. In the first, the levels of endogenous D-serine were determined by a specific chemiluminescent assay based on the D-amino acid oxidase/horseradish peroxidase/luminal system (Wolosker et al., 1999). With this method, we found that levels of the amino acid were significantly decreased in hippocampal tissues of old rats ($n = 7$) when compared with adults ($n = 9$) (Figure 4D, left). In parallel, the amounts of D-serine as well as those of its precursor L-serine were determined in a different pool of animals using conventional HPLC (Figure 4D, right). This experiment confirmed that hippocampal tissues derived from old rats ($n = 7$) had reduced levels of D-serine whereas the

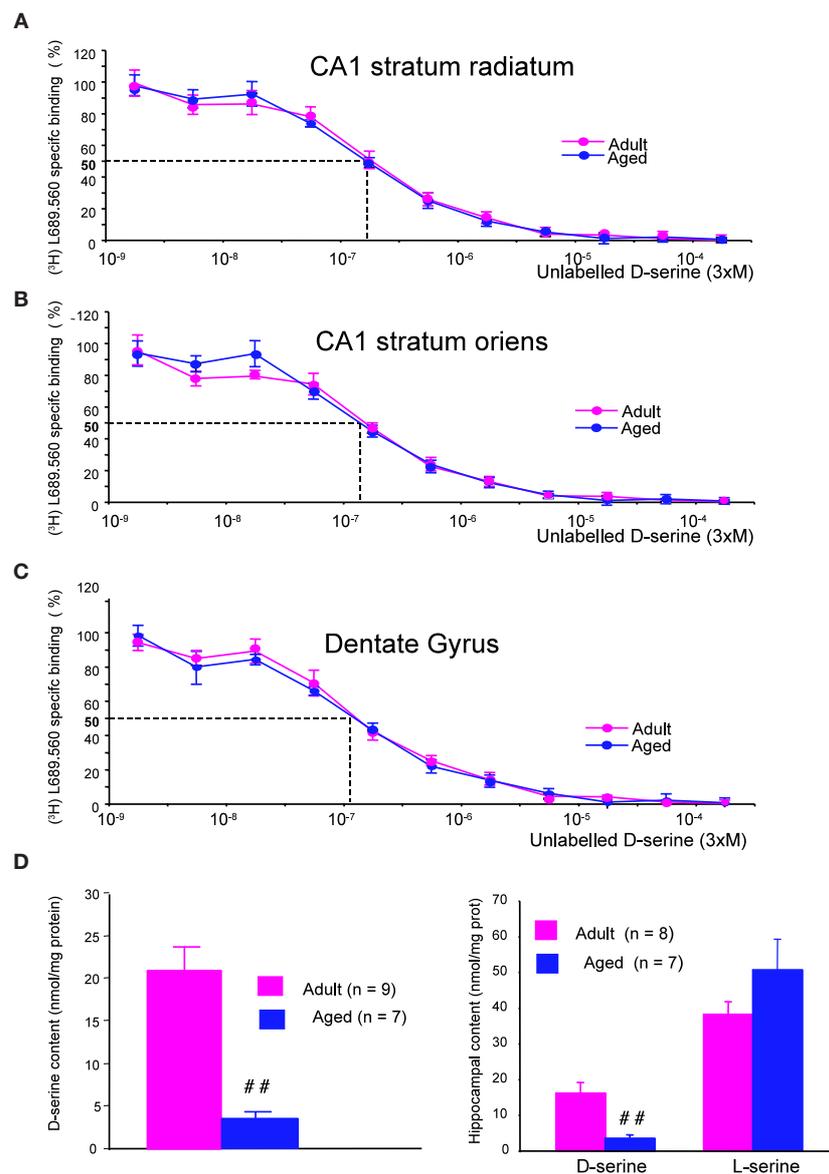


FIGURE 4 | Aging does not alter the affinity of D-serine binding sites but decreases D-serine availability. Representative mean displacement curves of specific [^3H] L689,560 binding by D-serine in the *stratum radiatum* of the CA1 (A), the *stratum oriens* of the CA1 (B) and the dentate gyrus (C) respectively of

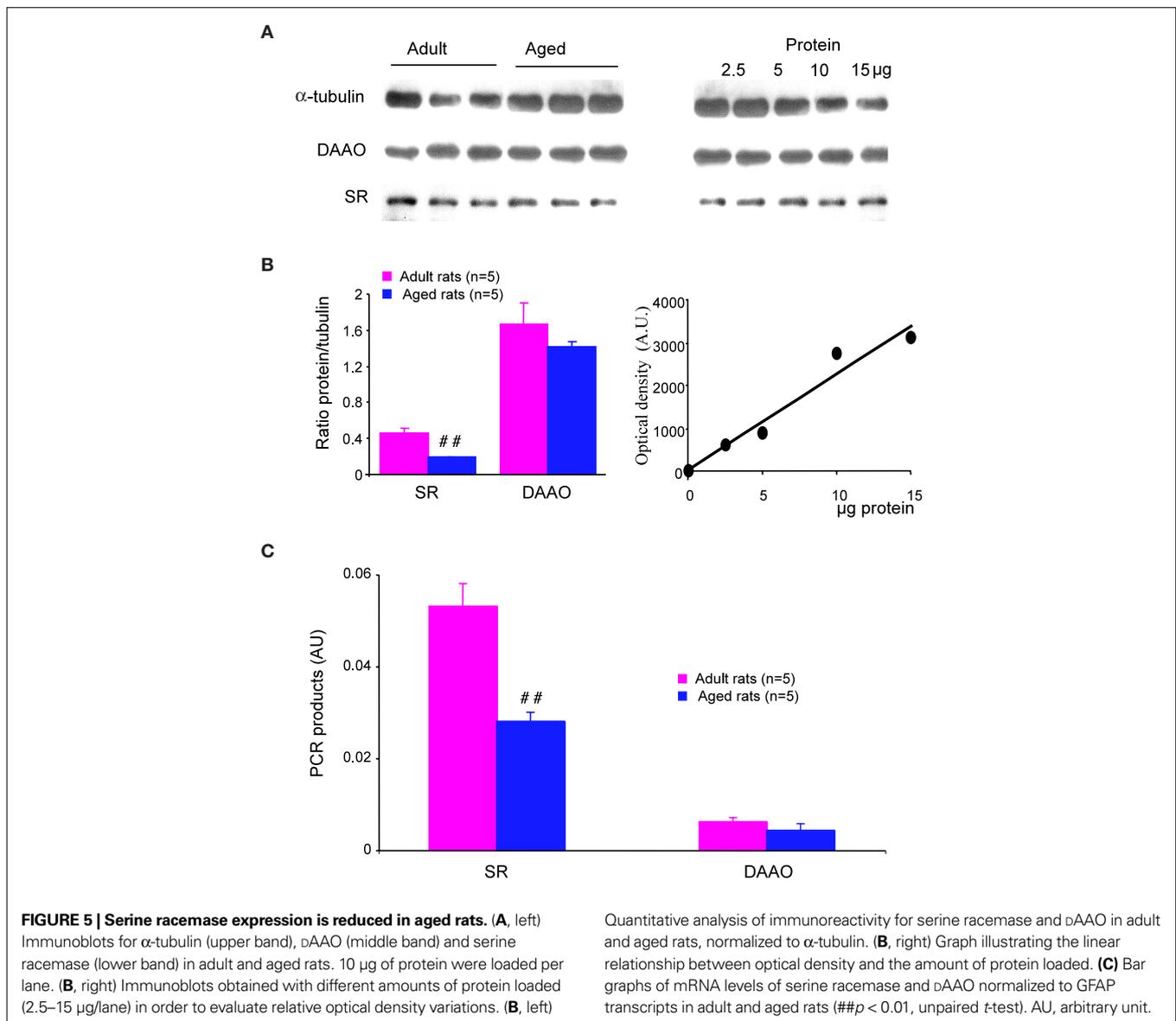
adult and aged rats. (D, left). Bar graph of mean D-serine levels (\pm SEM) determined by the chemiluminescent assay in adult and aged rats. (D, right) Bar graph of mean D-serine and L-serine levels (\pm SEM) determined by HPLC in adult and aged rats (## $p < 0.01$, unpaired t -test).

amount of L-serine tended to be higher (Figure 4D, right). As a consequence, the D/L-serine ratio was significantly lowered from 0.42 in young adult rats to 0.06 in old animals ($p < 0.001$).

This age-related decrease in D/L-serine ratio suggests that D-serine metabolism is impaired. We therefore checked for the expression of serine racemase (SR) and D-amino-acid oxidase (DAAO), the enzymes synthesizing and degrading D-serine respectively. In Western blots (Figure 5A), we detected a single band of 37-kDa corresponding to the predicted molecular mass of SR. Semi-quantitative analysis of samples from five young adult and five aged rats showed a significant age-related decrease in enzyme

expression (-42% , $p < 0.01$) once the amount of protein loaded was normalized to α -tubulin (Figure 5B). In contrast, the expression of DAAO, identified as a 39-kDa band, (Figure 5A) was not affected in aged animals (Figure 5B).

Similar results were obtained for mRNA levels. Indeed, quantitative PCR showed that mRNA levels for SR were significantly decreased in the hippocampus of aged rats ($p < 0.01$), whereas those for DAAO were not modified (Figure 5C). It is worth noting that the expression of the glutamate metabolizing enzyme glutamine synthetase is not affected, indicating that the glutamine/glutamate cycle is not altered by aging.



DISCUSSION

In the last century, the mortality of the world population has been substantially delayed by improvements in hygiene and nutrition and by better treatment for illnesses. However, this increase in life expectancy is unfortunately associated with deficits in learning and memory (cognitive) or in motivation (emotional) (Grady and Craik, 2000; Craik and Bialystok, 2006; Luo and Craik, 2008). Over the past few decades, extensive behavioral experiments in animal models of aging, mainly conducted in aged rodents of different strains and species, have clearly shown how efficient learning and memory in young individuals is slowed down with age, while forgetfulness is accelerated (Winocur and Moscovitch, 1990; Gallagher and Rapp, 1997; Miyamoto, 1997; Houston et al., 1999; Norris and Foster, 1999; Clayton et al., 2002b; Sykova et al., 2002; Gruart et al., 2008). In accordance with these studies, we have shown in our investigation that spatial learning is altered in aged Sprague–Dawley rats,

independent of sensory and/or motor dysfunctions. Identifying the functional changes in the brain that underlie cognitive aging is now of particular importance in order to improve quality of life in the elderly.

In the present report, we show that age-related deficits in spatial memory are correlated with changes in the ability of the aging brain to drive synaptic plasticity in neuronal networks of the hippocampus (see Junjaud et al., 2006; Mothet et al., 2006; Billard and Rouaud, 2007). When moderate synaptic activation is concerned, such as the activation evoked by TBS paradigms, the expression of LTP is impaired in aged animals (Moore et al., 1993; Tombaugh et al., 2002). We show that this form of LTP is blocked by the specific NMDA-R antagonist D-APV in both young adult and aged animals. Its impairment in the aging hippocampus is therefore likely to reflect a weaker activation of these subtypes of glutamatergic receptors. In contrast, age-related deficits in LTP are overridden by the

stronger synaptic activation induced by HFS protocols, indicating that additional mechanisms have come into play to compensate for the impaired NMDA-R activation. Indeed, synaptic plasticity is completely blocked in the hippocampus of aged rats only if HFS is delivered in the presence of D-APV and of the antagonist nifedipine, indicating that VGCCs also contribute to HFS-induced LTP in aged animals, as previously suggested (Shankar et al., 1998). Whatever the mechanisms that compensate for impaired NMDA-R activation, behavioral experiments reveal that they are not helpful in maintaining memory capacity in aged subjects at young adult levels. It is worth noting that VGCC activation is not related to memory acquisition, but only to the retention of information (Borroni et al., 2000) and that the excessive activation of the L-subtype of VGCCs may be detrimental to memory formation (Liu et al., 2003). Furthermore, we have shown that LTP is rapidly depotentiated in adult but not in aged animals, using an LFS protocol (Kamal et al., 1998). Since LTP saturation disrupts memory formation in young rats (Moser and Moser, 1999), a reduced capacity of hippocampal networks to be reset from potentiated levels may also constitute a synaptic mechanism contributing to cognitive aging. On the other hand, it has been reported that HFS-induced LTP is impaired in aged mice *in vivo* (Gruart et al., 2008), indicating that compensatory mechanisms involving VGCCs do not occur in this species. Alternatively, this discrepancy with our own results could be due to differences in experimental protocols (*in vivo* vs. *in vitro*, age of the animals, number of conditioning trains of stimuli).

As discussed above, age-related changes in synaptic plasticity are likely to reflect a shift in calcium sources, with a weaker role for NMDA-R and an increased contribution of VGCCs and intracellular stores with different kinetic properties, at least in the rat hippocampus (Kumar and Foster, 2005; Gant et al., 2006; Foster, 2007; Thibault et al., 2007). Our investigations confirm the age-related impairment in NMDA-R activation, as demonstrated by the decrease in the magnitude of isolated NMDA-R-dependent synaptic potentials in old animals (see also Barnes et al., 1997; Potier et al., 2000). Considering that only postsynaptic determinants are concerned (Burke and Barnes, 2006), it could be expected that a decrease in receptor number underlies this impairment. Accordingly, Clayton et al. (2002b) have reported that age-associated changes in LTP expression can be mimicked by reducing the density of NR2B subunits. Several studies have also shown that the number of NMDA receptors is decreased in the hippocampus of aged rats and mice, and that this decrease is correlated with memory impairments. However, this has not been seen in other studies and many investigations instead support the idea that NMDA-R density is unchanged or even increased during aging (see Billard et al., 1997 for a review). In addition, it has recently been shown in aged Lou/C/Jall rats that NMDA-R number is significantly reduced without changes in memory abilities or synaptic plasticity (Kollen et al., 2010). Finally, the present study shows that the magnitude of isolated NMDA-R-mediated potentials is not different in young adult and aged rats when all NMDA-Rs are recruited with saturating concentrations of the co-agonist D-serine. Taken together, these data indicate that an age-related decrease in NMDA-R number is not an essential mechanism in the weaker response of these receptors in aged animals, but rather the changes in their functional and/or pharmacological properties that are concerned.

N-Methyl-D-aspartate receptors activation relies on a voltage-dependent blockade by magnesium (Nowak et al., 1984) that is not affected in aged animals (Potier et al., 2000). It also needs the binding of a co-agonist at the strychnine-insensitive glycine modulatory site (Johnson and Ascher, 1987). In the last few years, the amino acid D-serine has been proposed as the main endogenous co-agonist of NMDA-R in the hippocampus, since its function, as revealed by biochemical and electrophysiological methods, are weakened by the selective degradation of D-serine by the degrading enzyme DAAO (Mothet et al., 2000; Yang et al., 2003). Our study shows that exogenous D-serine enhances isolated NMDA-R-mediated synaptic responses in both young adult (see also Watanabe et al., 1992; Martina et al., 2003; Krasteniakov et al., 2005) and aged rats but that the potency of the co-agonist is higher in the latter group. In addition, we have found that D-serine is able to reverse the age-related deficits in NMDA-R-mediated synaptic potentials and synaptic plasticity, including TBS-induced LTP and depotentiation, as has been previously reported in senescence-accelerated (SAMP8) mice (Yang et al., 2005). These results therefore indicate that the reduced activation of NMDA-R glycine binding sites by endogenous D-serine is a potent mechanism underlying the age-related deficits in synaptic plasticity.

The increased efficacy of D-serine supplementation with age may reflect changes in the degree of receptor saturation, determined by the specific affinity of the glycine modulatory site and/or changes in endogenous D-serine levels. Our binding studies have indicated that receptor affinity for D-serine remains unaffected in aged Sprague-Dawley rats, as reported in other strains of rats and in mice (Miyoshi et al., 1990; Nagata et al., 1998). In contrast, we provide evidence to show that endogenous levels of D-serine are dramatically reduced with aging. This result differs from previous studies showing no changes in D-serine levels in aged Wistar rats (Hashimoto et al., 1993) and SAMP8 mice (Nagata et al., 1998). A possible explanation for this discrepancy lies in differences between species or strains. Nevertheless, we have recently found that D-serine levels are also decreased in the hippocampus of aged Wistar rats (Turpin et al., 2009). An alternative possibility is that age-related changes in D-serine levels occur in restricted areas of the brain, since we used isolated hippocampi in our experiments whereas the study of Hashimoto et al. (1993) was performed with whole brain extracts.

The fact that D-serine levels are decreased while those of its precursor L-serine are simultaneously increased strongly argues for changes in the D-serine biosynthetic pathway during aging. Accordingly, we found that the expression of the synthesizing enzyme serine racemase is weakened in old rats, both at the mRNA and protein levels, whereas DAAO is not affected. It remains to be determined whether the activity of serine racemase is also altered. Other mechanisms amplifying the age-related decrease in the synaptic availability of D-serine, such as changes in its diffusion rate in the extracellular space (Sykova et al., 1998, 2002) and/or an increased reuptake by membrane transporters in both neuronal and glial cells (see Billard, 2008 for a review), remain to be investigated.

The ability of D-serine to prevent age-related deficits in synaptic plasticity makes this amino acid an attractive tool for the reduction of memory dysfunction in the aged. It is worth noting that

defects in spatial memory in aged rats (Aura and Riekkinen, 2000) and the disruption of the hippocampus-dependent associative eye-blink conditioning in old rabbits (Thompson and Disterhoft, 1997) are reduced by the partial agonist D-cycloserine, which also alleviates the age-related deficit in NMDA-R-mediated synaptic plasticity by acting on the glycine-binding site (Billard and Rouaud, 2007). Unfortunately, the possibility of the long-term treatment of cognitive defects with large doses of D-cycloserine or with D-serine itself has been discarded, because the former leads to side-effects in the central nervous system while the latter induces the DAAO-dependent necrosis of the terminal portions of the proximal renal tubules (Williams

and Lock, 2004; Krug et al., 2007). Alternatively, the fact that serine racemase is selectively affected in aged tissues opens new perspectives in the search for relevant strategies to reduce the memory impairment associated with aging, as has been recently suggested for neurological disorders including schizophrenia and Alzheimer's disease (Labrie et al., 2009; Tsai and Lin, 2009, see Billard, 2008 for a review).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/agingneuroscience/paper/10.3389/neuro.24/001.2010/>

REFERENCES

- Aura, J., and Riekkinen, P., Jr. (2000). Pre-training blocks the improving effect of tetrahydroaminoacridine and D-cycloserine on spatial navigation performance in aged rats. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 313–318.
- Barnes, C. A. (2003). Long-term potentiation and the ageing brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358, 765–772.
- Barnes, C. A., Rao, G., and Shen, J. (1997). Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartate-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol. Aging* 18, 445–452.
- Billard, J. M. (2008). D-Serine signalling as a prominent determinant of neuronal-glia dialogue in the healthy and diseased brain. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1872–1884.
- Billard, J. M., Jouvenceau, A., Lamour, Y., and Dutar, P. (1997). NMDA receptor activation in the aged rat: electrophysiological investigations in the CA1 area of the hippocampal slice *ex vivo*. *Neurobiol. Aging* 18, 535–542.
- Billard, J. M., and Rouaud, E. (2007). Deficit of NMDA receptor activation in CA1 hippocampal area of aged rats is rescued by D-cycloserine. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2260–2268.
- Borroni, A. M., Fichtenholtz, H., Woodside, B. L., and Teyler, T. J. (2000). Role of voltage-dependent calcium channel long-term potentiation (LTP) and NMDA LTP in spatial memory. *J. Neurosci.* 20, 9272–9276.
- Burke, S. N., and Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40.
- Clayton, D. A., Grosshans, D. R., and Browning, M. D. (2002a). Aging and surface expression of hippocampal NMDA receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 14367–14369.
- Clayton, D. A., Mesches, M. H., Alvarez, E., Bickford, P. C., and Browning, M. D. (2002b). A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* 22, 3628–3637.
- Craik, F. I., and Bialystok, E. (2006). Cognition through the lifespan: mechanisms of change. *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)* 10, 131–138.
- Foster, T. C. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 236–249.
- Foster, T. C. (2007). Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6, 319–325.
- Foster, T. C., and Norris, C. M. (1997). Age-associated changes in Ca²⁺-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7, 602–612.
- Gallagher, M., and Rapp, P. R. (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 48, 339–370.
- Gant, J. C., Sama, M. M., Landfield, P. W., and Thibault, O. (2006). Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J. Neurosci.* 26, 3482–3490.
- Grady, C. L., and Craik, F. I. (2000). Changes in memory processing with age. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 224–231.
- Gruart, A., Lopez-Ramos, J. C., Munoz, M. D., and Delgado-García, J. M. (2008). Aged wild-type and APP, PS1, and APP + PS1 mice present similar deficits in associative learning and synaptic plasticity independent of amyloid load. *Neurobiol. Dis.* 30, 439–450.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., and Takahashi, K. (1993). Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J. Neurochem.* 60, 783–786.
- Houston, F. P., Stevenson, G. D., McNaughton, B. L., and Barnes, C. A. (1999). Effects of age on the generalization and incubation of memory in the F344 rat. *Learn. Mem.* 6, 111–119.
- Izquierdo, I., and Medina, J. H. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63, 19–32.
- Johnson, J. W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529–531.
- Johnson, J. W., and Ascher, P. (1990). Voltage-dependent block by intracellular Mg²⁺ of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophys. J.* 57, 1085–1090.
- Junjaud, G., Rouaud, E., Turpin, F., Mothet, J. P., and Billard, J. M. (2006). Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat. *J. Neurochem.* 98, 1159–1166.
- Kamal, A., Biessels, G. J., Gispen, W. H., and Urban, I. J. (1998). Increasing age reduces expression of long-term depression and dynamic range of transmission plasticity in CA1 field of the rat hippocampus. *Neuroscience* 83, 707–715.
- Kim, S. J., and Linden, D. J. (2007). Ubiquitous plasticity and memory storage. *Neuron* 56, 582–592.
- Kollen, M., Stephan, A., Faivre-Bauman, A., Loudes, C., Sinet, P. M., Alliot, J., Billard, J. M., Epelbaum, J., Dutar, P., Jouvenceau, A. (2010). Preserved memory capacities in aged Lou/C/Jall rats. *Neurobiol. Aging* 31, 129–142.
- Krsteniakov, N. V., Martina, M., and Bergeron, R. (2005). Role of the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor in synaptic plasticity induced by pairing. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2782–2792.
- Krug, A. W., Volker, K., Dantzer, W. H., and Silbernagl, S. (2007). Why is D-serine nephrotoxic and alpha-aminoisobutyric acid protective? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F382–F390.
- Kumar, A., and Foster, T. C. (2005). Intracellular calcium stores contribute to increased susceptibility to LTD induction during aging. *Brain Res.* 1031, 125–128.
- Labrie, V., Fukumura, R., Rastogi, A., Fick, L. J., Wang, W., Boutros, P. C., Kennedy, J. L., Smeralul, M. O., Lee, F. H., Baker, G. B., Belsham, D. D., Barger, S. W., Gondo, Y., Wong, A. H., and Roder, J. C. (2009). Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3227–3243.
- Landfield, P. W. (1988). Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction. *Neurobiol. Aging* 9, 571–579.
- Liu, R., Liu, I. Y., Bi, X., Thompson, R. F., Doctrow, S. R., Malfroy, B., and Baudry, M. (2003). Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8526–8531.
- Luo, L., and Craik, F. I. (2008). Aging and memory: a cognitive approach. *Can. J. Psychiatry* 53, 346–353.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 84, 87–136.
- Martina, M., Krsteniakov, N. V., and Bergeron, R. (2003). D-Serine differentially modulates NMDA receptor function in rat CA1 hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J. Physiol. (Lond.)* 548, 411–423.
- Miyamoto, M. (1997). Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp. Gerontol.* 32, 139–148.
- Miyoshi, R., Kito, S., Doudou, N., and Nomoto, T. (1990). Age-related changes of strychnine-insensitive glycine receptors in rat brain as studied by *in vitro* autoradiography. *Synapse* 6, 338–343.
- Moore, C. I., Browning, M. D., and Rose, G. M. (1993). Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3, 57–66.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Moser, E. I., and Moser, M. B. (1999). Is learning blocked by saturation of

- synaptic weights in the hippocampus? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 661–672.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A., and 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.
- Mothet, J. P., Rouaud, E., Sinet, P. M., Potier, B., Jouvenceau, A., Dutar, P., Videau, C., Epelbaum, J., and Billard, J. M. (2006). A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5, 267–274.
- Nagata, Y., Uehara, T., Kitamura, Y., Nomura, Y., and Horiike, K. (1998). D-Serine content and D-[3H]serine binding in the brain regions of the senescence-accelerated mouse. *Mech. Ageing Dev.* 104, 115–124.
- Norris, C. M., and Foster, T. C. (1999). MK-801 improves retention in aged rats: implications for altered neural plasticity in age-related memory deficits. *Neurobiol. Learn. Mem.* 71, 194–206.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462–465.
- Potier, B., Poindessous-Jazat, F., Dutar, P., and Billard, J. M. (2000). NMDA receptor activation in the aged rat hippocampus. *Exp. Gerontol.* 35, 1185–1199.
- Puyal, J., Devau, G., Venteo, S., Sans, N., and Raymond, J. (2002). Calcium-binding proteins map the postnatal development of rat vestibular nuclei and their vestibular and cerebellar projections. *J. Comp. Neurol.* 451, 374–391.
- Rosenzweig, E. S., and Barnes, C. A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 69, 143–179.
- Shankar, S., Teyler, T. J., and Robbins, N. (1998). Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. *J. Neurophysiol.* 79, 334–341.
- Sykova, E., Mazel, T., Hasenohrl, R. U., Harvey, A. R., Simonova, Z., Mulders, W. H., and Huston, J. P. (2002). Learning deficits in aged rats related to decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus. *Hippocampus* 12, 269–279.
- Sykova, E., Mazel, T., and Simonova, Z. (1998). Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging. *Exp. Gerontol.* 33, 837–851.
- Thibault, O., Gant, J. C., and Landfield, P. W. (2007). Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 6, 307–317.
- Thompson, L. T., and Disterhoft, J. F. (1997). Age- and dose-dependent facilitation of associative eyeblink conditioning by D-cycloserine in rabbits. *Behav. Neurosci.* 111, 1303–1312.
- Tombaugh, G. C., Rowe, W. B., Chow, A. R., Michael, T. H., and Rose, G. M. (2002). Theta-frequency synaptic potentiation in CA1 in vitro distinguishes cognitively impaired from unimpaired aged Fischer 344 rats. *J. Neurosci.* 22, 9932–9940.
- Tsai, G. E., and Lin, P. Y. (2009). Strategies to enhance N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in schizophrenia, a critical review and meta-analysis. *Curr. Pharm. Des.* [Epub ahead of print], PMID: 19909229.
- Turpin, F. R., Potier, B., Dulong, J. R., Sinet, P. M., Alliot, J., Oliet, S. H., Dutar, P., Epelbaum, J., Mothet, J. P., and Billard, J. M. (2009). Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiol. Aging*. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.001.
- Wang, J. H., Ko, G. Y., and Kelly, P. T. (1997). Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *J. Clin. Neurophysiol.* 14, 264–293.
- Watanabe, Y., Saito, H., and Abe, K. (1992). Effects of glycine and structurally related amino acids on generation of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 223, 179–184.
- Williams, R. E., and Lock, E. A. (2004). D-Serine-induced nephrotoxicity: possible interaction with tyrosine metabolism. *Toxicology* 201, 231–238.
- Winocur, G., and Moscovitch, M. (1990). Hippocampal and prefrontal cortex contributions to learning and memory: analysis of lesion and aging effects on maze learning in rats. *Behav. Neurosci.* 104, 544–551.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., and Snyder, S. H. (1999). Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13409–13414.
- Yang, S., Qiao, H., Wen, L., Zhou, W., and Zhang, Y. (2005). D-Serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8. *Neurosci. Lett.* 379, 7–12.
- 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. U.S.A.* 100, 15194–15199.

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

Received: 10 November 2009; paper pending published: 17 November 2009; accepted: 07 January 2010; published online: 05 February 2010.

Citation: Potier B, Turpin FR, Sinet P-M, Rouaud E, Mothet J-P, Videau C, Epelbaum J, Dutar P and Billard J-M (2010) Contribution of the D-Serine-dependent pathway to the cellular mechanisms underlying cognitive aging. *Front. Ag. Neurosci.* 2:1. doi: 10.3389/neuro.24.001.2010

Copyright © 2010 Potier, Turpin, Sinet, Rouaud, Mothet, Videau, Epelbaum, Dutar and Billard. This is an open-access article subject to an exclusive license agreement between the authors and the Frontiers Research Foundation, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are credited.

Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat

G. Junjaud,* E. Rouaud,* F. Turpin,* J.-P. Mothet† and J.-M. Billard*

*Neurobiologie de la Croissance et de la Sénescence, INSERM, Faculté de Médecine, Université Paris-Descartes, Paris, France

†Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS, Gif sur Yvette, France

Abstract

The effects of the co-agonist of the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) D-serine on glutamatergic neurotransmission and synaptic potentiation were studied in the CA1 hippocampal field of young (3–5 months old) and aged (25–27 months old) Sprague–Dawley rats using *ex vivo* extracellular electrophysiological recording techniques. Exogenous D-serine depressed fast neurotransmission mediated by the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainate subtype of glutamate receptors in young but not in aged rats by acting on inhibitory glycinergic interneurons. In contrast, D-serine dose-dependently enhanced NMDAr-mediated synaptic responses in both

groups of animals, but with a larger magnitude in aged rats, thus preventing the age-related decrease in NMDAr activation. D-serine also increased the magnitude of long-term potentiation in aged but not in young rats. Finally, D-serine levels were dramatically reduced in hippocampal tissues of aged rats. Taken together, these results indicate a weaker activation of the NMDAr glycine modulatory site by endogenous D-serine in aged animals, which accounts for a reduced NMDAr contribution to synaptic plasticity in ageing.

Keywords: ageing, glia, glutamate, hippocampus, long-term potentiation, synaptic plasticity.

J. Neurochem. (2006) **98**, 1159–1166.

Preventing age-related memory deficits, which are exacerbated in pathological states such as Alzheimer's disease, is a major challenge for neuroscientists in this, the beginning of the 21st century. Although initial research focused on cholinergic systems (see Bartus 2000), investigations now converge on glutamatergic pathways. Indeed, synaptic plasticity, which refers to long-term potentiation (LTP) or depression (LTD) of glutamatergic neurotransmission, is considered as the main neuronal activity underlying memory formation (Martin *et al.* 2000). The activation of the *N*-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors (NMDAr) is critical for the induction of synaptic plasticity (Bliss and Collingridge 1993). NMDAr activation is impaired in aged animals (Barnes *et al.* 1997; Potier *et al.* 2000; Clayton *et al.* 2002), reflecting a weaker receptor density and/or changes in their electrical properties (Magnusson 2000; Kuehl-Kovarik *et al.* 2000; Clayton and Browning 2001). In addition to glutamate, NMDAr activation requires, in the hippocampus, the binding of D-serine at the strychnine-insensitive glycine site (Mothet *et al.* 2000; Yang *et al.* 2003). Indeed, D-serine, which is produced in glial cells (Schell *et al.* 1995; Wolosker

et al. 1999; Williams *et al.* 2006), is necessary for the induction of NMDAr-dependent synaptic plasticity (Yang *et al.* 2003; Yang *et al.* 2005). Considering the decrease in D-serine content recently reported in the hippocampus of aged rats (Mothet *et al.* 2006; Williams *et al.* 2006), it was important to determine to which extent the co-agonist contributed to the functional alterations observed in hippocampal networks during ageing. In the present study, we have analysed the effects of exogenous D-serine on

Received February 28, 2006; revised manuscript received April 3, 2006; accepted April 4, 2006.

Address correspondence and reprint requests to Dr J. M. Billard, INSERM U549, 2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

E-mail: billard@broca.inserm.fr

Abbreviations used: 2-APV, D-2-amino-5-phosphonovalerate; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; DAAO, D-amino acid oxidase; fEPSP, field excitatory post-synaptic potential; HFS, high-frequency stimulation; I/O, input/output; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; NMDAr, NMDA receptor; PFV, presynaptic fibre volley.

glutamatergic neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of young and aged rats.

Materials and methods

Animals

Experiments were conducted in 2–4 month-old ($n = 32$) and 25–27 month-old ($n = 27$) male Sprague–Dawley rats purchased from IFFA-CREDO (L'Arbresle, France). Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/809/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures and approved by the local ethical committee. Rats were housed five per cage and were maintained on a controlled light–dark cycle at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with *ad libitum* access to food and water.

One animal was daily studied using extracellular recordings in the *ex vivo* slice preparation. The rat was anaesthetized with halothane and decapitated. The hippocampus was quickly removed and placed in a cold medium. Slices (400 μm thick) were cut and placed in a holding chamber. After a pre-incubation period, a single slice was transferred on the net in the submerged brain slice chamber and continuously perfused (2 mL/min) with an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) pre-gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 . The composition of the aCSF was as follows (in mM): NaCl 124, KCl 3.5, MgSO_4 1.5, CaCl_2 2.3, NaHCO_3 26.2, NaH_2PO_4 1.2, glucose 11. Extracellular recordings were obtained at 25–30°C from the apical dendritic layer of the CA1 area using micropipettes filled with 2 M NaCl (resistance of 2–6 M Ω). Presynaptic fibre volleys (PFVs) and field excitatory post-synaptic potentials (fEPSPs) were evoked every 10 s by electrical stimulation of afferent fibres (Schaffer collaterals and commissural fibres) located in the stratum radiatum. Stimuli (20- or 100- μs duration) were applied between the two poles of a bipolar electrode, one pole inserted into the slice and the other in the aCSF just above the slice.

Synaptic transmission

Input/output (I/O) curves were constructed in order to assess the responsiveness of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA)/kainate subtype of glutamate receptors to electrical stimulation in young and aged rats, and to compare the effects of exogenous D-serine in both groups of animals. The slope of three averaged PFVs and fEPSPs were measured and plotted against different intensities of stimulation (from 100 to 500 μA) using the Acquis 1 software (CNRS, Paris, France). I/O curves were constructed before and 15 min after D-serine was added to the aCSF. To determine the magnitude of D-serine effects, changes in fEPSP slope expressed as the percentage of the control value were averaged for intensities from 200 to 500 μA .

I/O curves of NMDA-mediated synaptic responses were constructed in young and aged rats. In these experiments, slices were perfused in a low (0.1 mM) magnesium aCSF supplemented with the AMPA/kainate receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μM) and with picrotoxin (10 μM) to block the inhibitory neurotransmission. A knife cut separating CA3 and CA1 was introduced to prevent the propagation of epileptiform discharges. Dose-dependent effects of D-serine (from 2 to 200 μM) were determined as reported above for AMPA/kainate receptor-mediated synaptic transmission.

Synaptic plasticity

In order to investigate short-term synaptic potentiation (STP), test stimuli were applied every 10 s and adjusted to get a baseline fEPSP at 30% of maximum response. The initial slope of 3 averaged fEPSPs was measured for 10 min before the delivery of a 30 Hz conditioning stimulation (1-s duration at test intensity). Test with single pulse was then resumed for 30 min. For LTP experiments, a baseline fEPSP was obtained using test stimuli applied every 15 s for 15 min. The conditioning stimulation consisted of two high-frequency trains (100 Hz for 1 s at test intensity) separated by a 20-s interval. Test with single pulse was then resumed for 60 min to determine the level of stable LTP. In both STP and LTP experiments, D-serine was present in the aCSF throughout the recording.

Drugs including D-serine, glycine, CNQX, D-2-amino-5-phosphonovalerate (2-APV), nifedipine and picrotoxin were purchased from Tocris (Illkirch, France) and strychnine was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). They were all dissolved in water, except for CNQX and nifedipine, which were dissolved in dimethylsulfoxide (final concentration 0.01%).

Determination of D-serine content in the hippocampus

Free amino acids were extracted from hippocampal tissue that was not used for slicing with trichloroacetic acid according to published procedures (Schell *et al.* 1997) and stored at -80°C until the assay. D-Serine was quantified using a chemiluminescent assay based on the D-amino acid oxidase (DAAO)/horseradish peroxidase/luminol system (Wolosker *et al.* 1999). The amount of D-serine was adjusted to the content of proteins determined by a Dc protein Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Standards of D-serine were used to normalize results.

Statistics

All results are expressed as mean \pm SEM. In order to take into account the correlation inherent to repeated measure data, significance between young and aged rats was calculated using ANOVA. In all cases, differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

D-serine decreases fast synaptic transmission in young but not in aged rats

In a control aCSF, stimulation of the stratum radiatum induced a PFV followed by an AMPA/kainate receptor-mediated fEPSP (see the insert in Fig. 1b), totally suppressed by CNQX (10 μM) added at the end of the recording. I/O curves constructed in young (24 slices/12 animals) and aged rats (21 slices/12 animals) showed that PFVs were not affected ($F_{1,43} = 1.33$, NS; Fig. 1a), whereas fEPSP slopes were significantly weaker in old animals ($F_{1,43} = 9.61$, $p < 0.01$; Fig. 1b).

D-serine (20 μM) significantly decreased AMPA/kainate receptor-mediated synaptic responses in young rats ($p < 0.01$; Fig. 1c, upper panel) by an average of $13.9 \pm 3.7\%$ (10 slices/6 animals). Similarly, a decrease of $10.1 \pm 3.6\%$ was induced by glycine (11 slices/5 animals; data not shown). D-serine

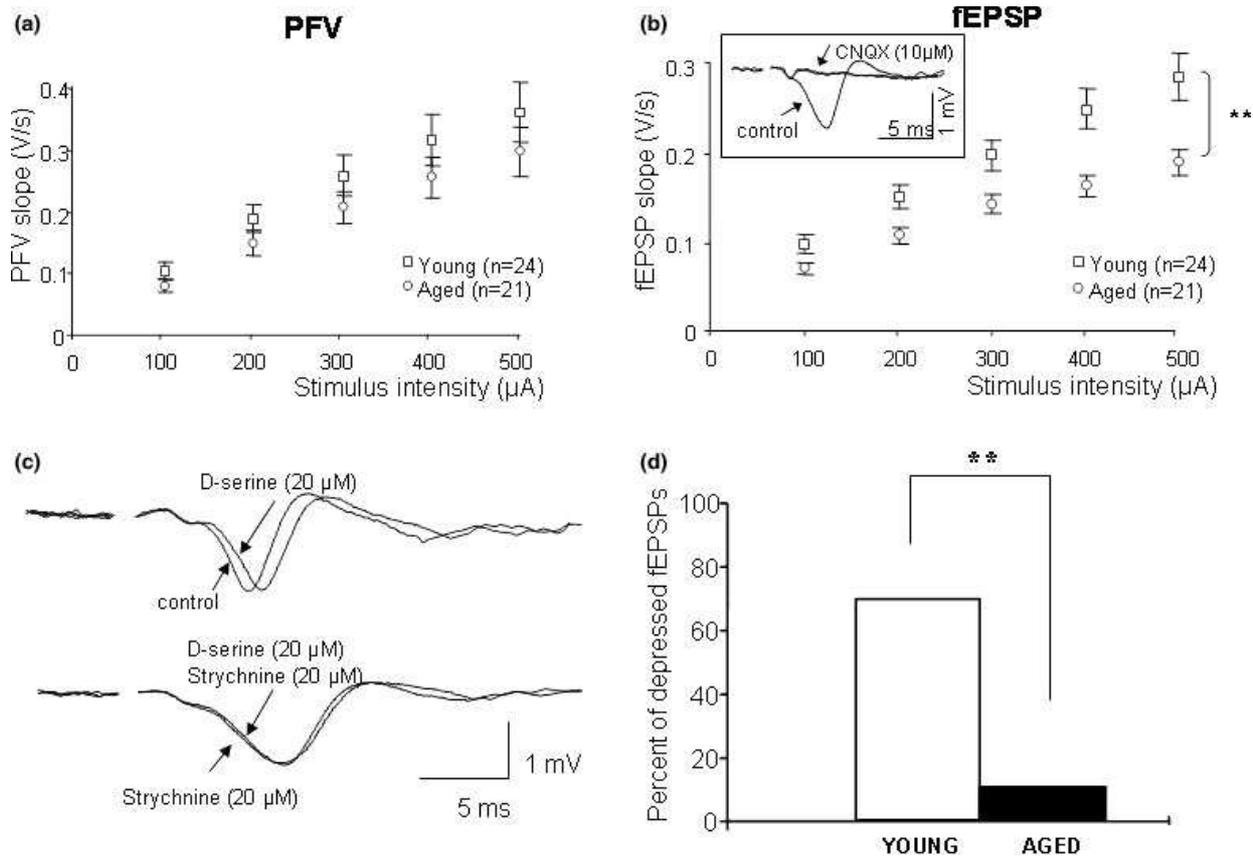


Fig. 1 Age-related effect of D-serine on AMPA/kainate receptor-mediated synaptic responses. (a) Plot of the mean PFV slope against the stimulus intensity in young (open squares) and aged (open circles) rats. (b) Plot of the mean fEPSP slope against the stimulus intensity in young and aged rats. $**p < 0.01$, ANOVA repeated measures. In the insert are responses recorded in a young rat before (a) and after (b) application of the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX ($10 \mu\text{M}$).

was no longer effective in slices previously bathed with the glycinergic antagonist strychnine ($20 \mu\text{M}$; 7 slices/5 animals; Fig. 1c, lower panel). We reasoned that D-serine reduces AMPA/kainate receptor-mediated neurotransmission in young animals by acting on inhibitory glycinergic receptors. Interestingly, only one out of 10 fEPSPs (6 animals) was depressed by D-serine in slices prepared from aged animals as compared with seven in young animals (Fig. 1d), suggesting that glycinergic inhibitory receptors are impaired in the hippocampus in the course of ageing.

D-serine facilitates NMDAR-mediated synaptic transmission more in aged than in young rats

To define the age-related effects of D-serine on NMDAR activation, fEPSPs were recorded in low magnesium medium supplemented with CNQX and picrotoxin. These potentials were blocked by the competitive antagonist 2APV ($30 \mu\text{M}$; see the insert in Fig. 2a). I/O curves plotted from data

(c) Examples of fEPSPs recorded in a young rat before and in the presence of D-serine ($20 \mu\text{M}$; upper). Examples of fEPSPs recorded in the presence of D-serine ($20 \mu\text{M}$) before and after addition of the glycinergic antagonist strychnine ($20 \mu\text{M}$) before and after addition of D-serine ($20 \mu\text{M}$; lower). (d) Bar graphs of the number of depressed fEPSPs by exogenous D-serine in young (white column) and aged (black column) rats; $**p < 0.01$, χ^2 test.

collected on 51 slices prepared from 24 young rats and 31 slices from 19 aged animals indicated that mean fEPSP slopes were significantly reduced in aged rats ($F_{1,74} = 7.6$, $p = 0.01$; Fig. 2a), whereas presynaptic excitability remained unchanged as PFVs were not statistically affected ($F_{1,74} = 1.46$, NS).

D-serine (2 – $200 \mu\text{M}$) dose-dependently increased NMDAR-dependent synaptic potentials, but the increase was significantly higher in aged rats whatever the concentration of the co-agonist (Fig. 2b). As a consequence, the age-related deficit of NMDAR-mediated fEPSPs was prevented in slices supplied with D-serine. We also observed the same potentiation effect of glycine ($20 \mu\text{M}$), another co-agonist of NMDAR, over ageing (data not shown). In contrast, L-serine ($100 \mu\text{M}$), the precursor of D-serine, did not significantly affect NMDAR-dependent synaptic potentials, either in young (10 slices/6 animals) or in old rats (9 slices/5 animals; data not shown).

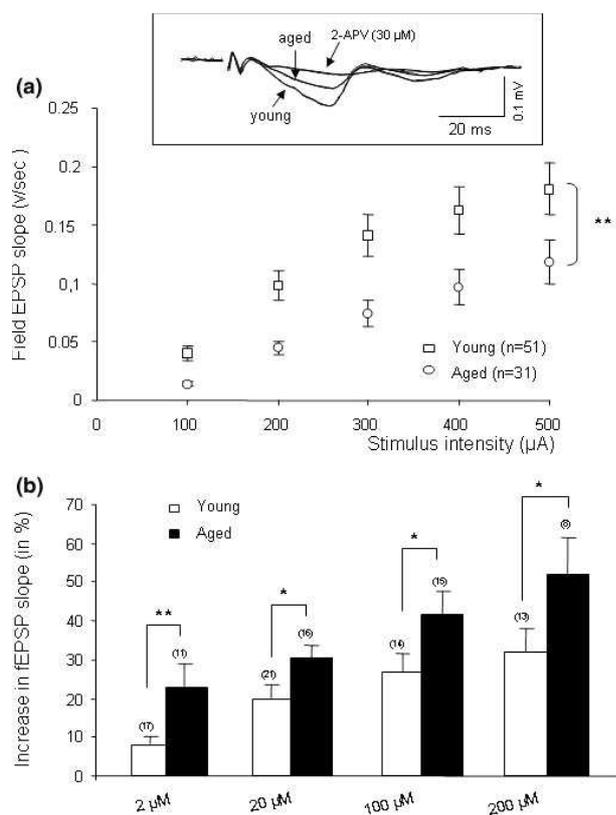


Fig. 2 Age-related effect of D-serine on NMDA receptor-mediated synaptic responses. (a) Plot of the mean NMDA-mediated fEPSP slope against the stimulus intensity in young (open squares) and aged (open circles) rats. In the insert are representative responses recorded in the two groups of animals for a stimulus intensity of 400 μA, and a loss of response in the presence of the NMDA receptor antagonist 2-APV (30 μM). (b) Bar graphs of the mean increase in fEPSP slope as a function of D-serine concentration in young (white columns) and aged (black columns) rats. In parentheses are indicated the number of tested slices; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, unpaired t -test.

D-serine facilitates LTP induction in aged but not in young rats

The magnitude and time course of synaptic potentiation in response to 30 Hz stimulation of the stratum radiatum were determined in a control aCSF from 13 slices of 8 young rats. In response to the conditioning stimulation, short-term potentiation (STP) of synaptic transmission was induced that lasted for 15 min (Fig. 3a). Addition of D-serine (12 slices/8 animals) significantly enhanced the initial phase of STP [first 5 min ($F_{1,22} = 4.65$, $p < 0.05$), but no statistical effect was found for the remaining period of recording ($F_{1,22} = 0.89$, NS), indicating a facilitating but transient effect of D-serine in young animals (Fig. 3a).

Figure 3(b) illustrates the effects of 30 Hz conditioning stimulation induced in aged rats. The magnitude and time course of STP recorded in control aCSF (13 slices/9 ani-

mals) were not significantly different to the short-lasting potentiation induced in young rats ($F_{1,21} = 0.34$, NS). However, D-serine had a more pronounced potentiating effect on STP recorded in old rats (12 slices in 7 animals). Indeed, the magnitude of both the initial and late phase were significantly increased by the agonist in these animals [$(F_{1,22} = 12.95$, $p = 0.01$) and ($F_{1,22} = 15.19$, $p < 0.001$), respectively], showing that synaptic transmission remained statistically potentiated 30 min after the conditioning stimulation (Fig. 3b). When the glycine modulatory site of NMDAR was first saturated with a high concentration of glycine (100 μM in the presence of strychnine to block glycinergic inhibition, 6 slices/3 animals), D-serine did not potentiate STP in aged rats, confirming that the facilitating effect of the agonist is driven through the modulatory site of NMDA (data not shown). These results indicate that exogenous D-serine is able to facilitate the induction of long-lasting potentiation of glutamatergic transmission in aged but not in young animals.

D-serine increased LTP magnitude in aged but not in young rats

LTP of synaptic transmission in response to high-frequency stimulation (HFS) of glutamatergic afferents was studied in 20 slices of 17 young rats. In control aCSF, HFS induced a strong potentiation of fEPSP slope (just less than 300% of baseline value; Fig. 3c) that progressively recovered, but stabilized to an increase around 50% over the recording period of 60 min. When HFS was delivered in the presence of D-serine (12 slices/7 animals), no significant modifications in LTP magnitude and time course were revealed, compared with control conditions ($F_{1,30} = 0.86$, NS; Fig. 3c).

HFS-induced LTP was determined in 13 slices from 11 aged rats in a control aCSF. No age-related deficit was found ($F_{1,31} = 0.001$, NS). By contrast, a striking age-dependent effect of D-serine was revealed, as LTP was significantly facilitated by the co-agonist in old animals ($F_{1,21} = 4.33$, $p = 0.05$; Fig. 3d). Thus, in addition to a lower LTP threshold, exogenous D-serine is also able to enhance the magnitude of HFS-induced LTP in aged rats.

D-serine content is decreased in the hippocampal tissue of aged rats

The greater efficiency of D-serine in aged animals, at the level of both synaptic potentials and synaptic plasticity, suggested a deficiency in the rate of occupancy of the NMDAR glycine modulatory site during ageing. We therefore determined D-serine levels in the hippocampal tissue in both groups of rats. Analysis of endogenous D-serine content revealed that the amount of the amino acid in young rats (20.7 ± 3.3 nmol/mg of proteins, $n = 9$) significantly decreased to 3.3 ± 0.4 nmol/mg of proteins ($n = 7$) in aged rats ($p < 0.001$).

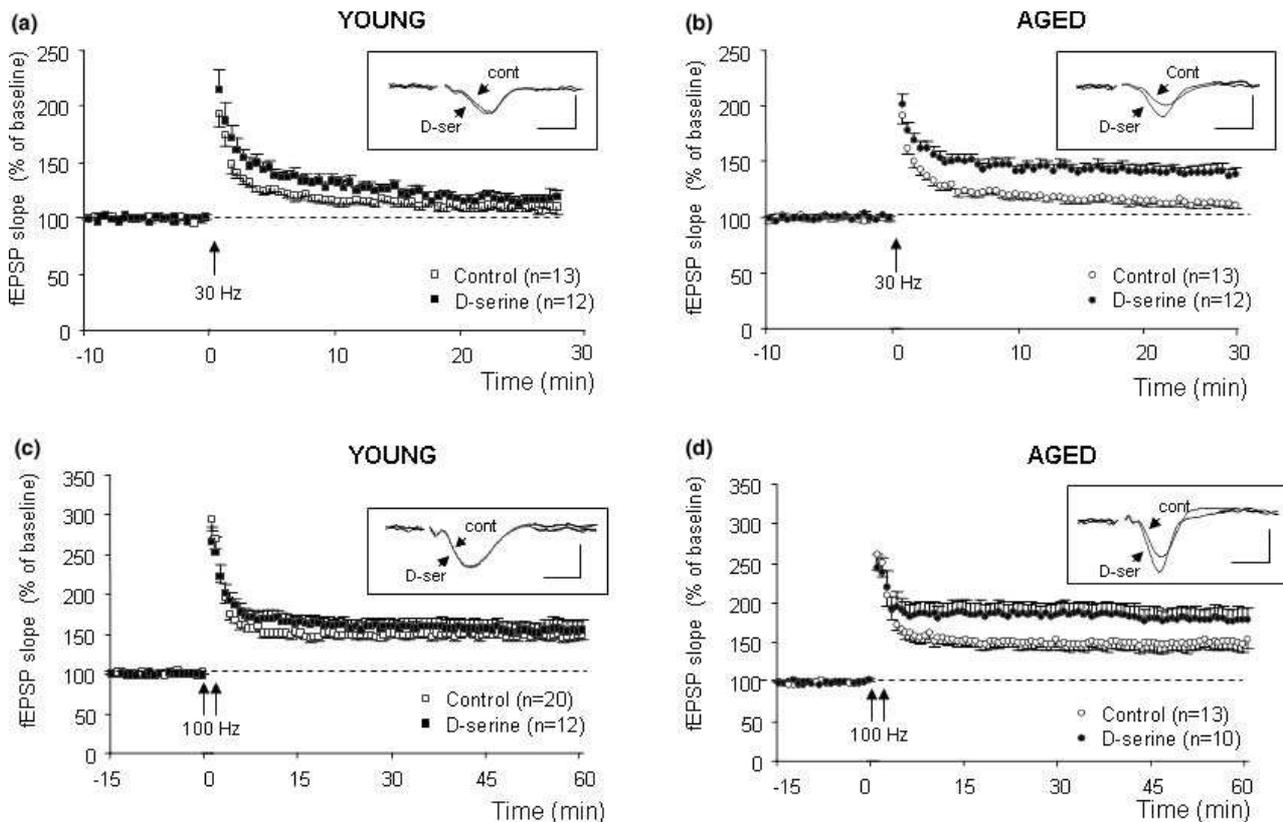


Fig. 3 Age-related effect of D-serine on short- and long-term potentiation of synaptic transmission. (a) Short-term potentiation (STP) expressed as the per cent change in fEPSP slope versus time recorded in slices of young rats in control medium (open squares) and in the presence of D-serine (100 μ M) after 30 Hz (1 s duration) conditioning stimulation (arrow). (b) STP recorded in aged animals in the same conditions (control, open circles; D-serine, filled circles). (c) Long-term potentiation of fEPSPs induced by HFS (two trains at

100 Hz for 1 s). The plots present the time course of changes in fEPSP slope before and for 1 h after HFS (arrow) in young rats in control medium (open squares) and in the presence of D-serine (100 μ M; filled squares). (d) Plots of LTP averaged from slices of aged rats in the same experimental conditions (control, open circles; D-serine, filled circles). Insets are superimposed examples of fEPSPs recorded in control condition and 25 min after the conditioning stimulation for STP and 60 min for LTP. Bar scales: 1 mV and 10 ms.

Synaptic potentiation is closely dependent on NMDAR in young but not in aged rats

Considering the lower NMDAR activation in aged rats because NMDAR glycine binding sites are probably much less saturated by endogenous D-serine, it is quite surprising that the synaptic potentiation recorded in the control aCSF was not altered in these animals as compared with young rats. Alternately, this result suggests that compensatory mechanisms had occurred in the hippocampal slices of aged rats.

HFS was delivered in 10 slices from 8 young rats in the presence of 2APV (80 μ M). In these conditions, a weak and transient increase in synaptic transmission was induced that returned towards baseline values after 3 min (Fig. 4a). By contrast, the conditioning stimulation induced in the same conditions in aged rats (10 slices/9 animals) induced a significant potentiation (around 20% increase) that lasted until the end of the recording ($F_{1,21} = 27.9$, $p < 0.0001$;

Fig. 4a). These results confirm that HFS-induced LTP depends exclusively on NMDAR in young rats, but that other mechanisms are involved in aged animals. We then investigated the contribution of voltage-gated calcium channels, which are up-regulated in the course of ageing (Thibault and Landfield 1996; Thibault *et al.* 2001). LTP recorded in 6 slices of 4 young rats was not affected by the voltage-gated calcium channels' blocker nifedipine (10–50 μ M; data not shown). In fact, the increase in fEPSP slope determined from the last 15 min averaged $47.1 \pm 1.1\%$ of baseline value versus $48.8 \pm 0.4\%$ in the control aCSF. In contrast, LTP magnitude was significantly reduced by nifedipine in aged rats (5 slices/3 animals) and the increase averaged 30.2 ± 1.5 vs. $50.7 \pm 0.5\%$ in control conditions ($p < 0.05$). Finally, LTP was studied in three old rats in which slices ($n = 5$) were bathed with an aCSF supplemented by 2APV and nifedipine. In these conditions, the HFS-induced-potentiation was totally occluded (Fig. 4b).

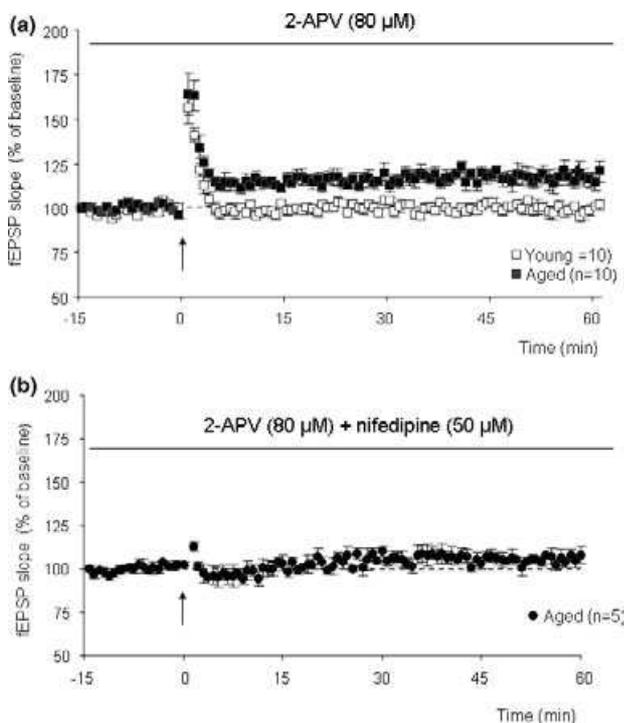


Fig. 4 HFS-induced long-term potentiation involves voltage-gated calcium channels in aged but not in young rats. (a) Plots of LTP induced by HFS (arrow) in young (open squares) and aged (filled squares) rats in the presence of the NMDAR antagonist 2APV ($80 \mu\text{M}$). (b) Plot of LTP recorded in aged rats in the presence of the voltage-gated calcium channels blocker nifedipine ($50 \mu\text{M}$) and 2APV ($80 \mu\text{M}$).

Discussion

Initially assigned to glycine (Johnson and Ascher 1987; Reynolds *et al.* 1987; Kemp and Leeson 1993), a major role in activating the strychnine-insensitive glycine modulatory site of NMDAR in the hippocampus is now attributed to the inverted amino acid D-serine (see Miller 2004 for a review). A decrease in D-serine content by the DAAO reduces hippocampal NMDAR-mediated synaptic potentials and blocks LTP induction (Mothet *et al.* 2000; Yang *et al.* 2003; Yang *et al.* 2005; Mothet *et al.* 2006;). In the present study, we show that exogenous D-serine increases NMDAR-mediated synaptic potentials (Martina *et al.* 2003, see also Watanabe *et al.* 1992), indicating that glycine modulatory sites are not fully saturated by the endogenous agonist in CA1 hippocampal slice preparation of young adult rats (Krasteniakov *et al.* 2005). As a consequence, STP of synaptic transmission, that is closely dependent on a moderate NMDAR activation, is transiently facilitated by D-serine. This is at variance with the effect of the other agonist of the NMDAR glycine binding site D-cycloserine which, at the same concentration, is able to convert STP to LTP (Rouaud and Billard 2003). Besides a difference in intrinsic pharmacological properties of the two agonists, the weaker

efficiency of D-serine may be as a result of a faster diffusion out of the synaptic cleft. However, we do not find any significant effect of D-serine on HFS-induced LTP (Ramakers *et al.* 1993; Ballard *et al.* 2002), probably because endogenous D-serine is massively released from glial cells in response to the strength of this conditioning stimulation that already saturates NMDAR (Krasteniakov *et al.* 2005).

The main result of our study concerns the much higher efficiency of exogenous D-serine on NMDAR activation in aged than in young animals. We first confirm that NMDAR-mediated synaptic responses are significantly depressed in old rats (Barnes *et al.* 1997; Eckles-Smith *et al.* 2000; Potier *et al.* 2000; Clayton *et al.* 2002) and provide evidence that this deficit is reversed by D-serine (see also Mothet *et al.* 2006). In addition, we show that D-serine is able to facilitate the induction and to increase the magnitude of LTP only in the aged rat, as also recently reported in aged senescence-accelerated mice prone/8 (Yang *et al.* 2005). These results, indicating that NMDAR activation is significantly more sensitive to exogenous D-serine in aged rats, suggest a lower occupancy of the glycine modulatory site by the endogenous ligand in these animals. Indeed, using a selective fluorimetric assay for D-serine, the content of the co-agonist is dramatically reduced in the hippocampus of aged rats, as was previously reported by conventional HPLC techniques (Mothet *et al.* 2006).

Considering a lower NMDAR activation by endogenous D-serine in aged animals, it appeared surprising that the magnitude of HFS-induced synaptic potentiation was not significantly depressed as compared with young rats. Interestingly, theta-burst-induced LTP recorded in aged animals is impaired (Mothet *et al.* 2006). One striking difference between these two electrophysiological protocols results in the duration of the conditioning stimulation (1 s for the HFS used here against 200 ms for theta-burst). One can speculate that compensatory mechanisms may occur during the prolonged HFS. Accordingly, we show that calcium channels significantly participate in HFS-induced LTP in aged but not in young rats. Therefore, the weaker NMDAR-dependent contribution to synaptic plasticity in aged rats can be overcome by an up-regulation of calcium channels (Thibault and Landfield 1996; Thibault *et al.* 2001) when a prolonged conditioning activation is concerned (Shankar *et al.* 1998; Watanabe and O'Dell 2003).

It was recently reported that concentrations $>1 \mu\text{M}$ of D-serine often resulted in drug-related decreases of fast glutamatergic excitatory post-synaptic currents in young rats (Krasteniakov *et al.* 2005). We confirm here this depressive effect on AMPA/kainate receptor-dependent neurotransmission, and provide some pharmacological evidence that it is mediated by activation of inhibitory glycine receptors. Similarly, glycine receptor-dependent inhibitory effects on fast neurotransmission were previously reported for D-cycloserine (Rouaud and Billard 2003), as well as for

other amino acids including β -alanine and taurine (Chattipakorn and McMahon 2002; Mori *et al.* 2002). Interestingly, the depressive effect of D-serine, as well as of D-cycloserine, is not observed in aged rats (Rouaud and Billard, unpublished results). This indicates a dual beneficial effect of D-serine on hippocampal synaptic activity in aged as compared with young animals: (i) its efficiency to facilitate NMDA-dependent processes is increased and (ii) it does not depress basal synaptic neurotransmission. Such an ability to prevent the age-related deficit of NMDA-dependent cellular mechanisms of learning and memory would make D-serine an attractive tool to reduce age-associated cognitive alterations. Unfortunately, long-term treatments of such deficits with large doses of D-serine itself seem unlikely because of nephrotoxic side-effects of the co-agonist (Silbernagl *et al.* 1999). Nevertheless, in a 3–4-week clinical trial, D-serine improved cognitive symptoms in schizophrenic patients taking non-clozapine anti-psychotics, without any effect on renal function when doses less than 4% of the renal toxic dose were used (Tsai *et al.* 1999). Alternately, a recent study (Mothet *et al.* 2006) suggests that serine racemase, the D-serine synthesis enzyme, may serve as a relevant target for therapeutic strategies to abolish memory deficits related to brain ageing.

References

- Ballard T. M., Pauly-Evers M., Higgins G. A., Ouagazzal A. M., Mutel V., Borroni E., Kemp J. A., Bluethmann H. and Kew J. N. (2002) Severe impairment of NMDA receptor function in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site results in drug-resistant nonhabituating hyperactivity. *J. Neurosci.* **22**, 6713–6723.
- Barnes C. A., Rao G. and Shen J. (1997) Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartate_R-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol. Aging*, **18**, 445–452.
- Bartus R. T. (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **163**, 495–529.
- Bliss T. V. P. and Collingridge G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39.
- Chattipakorn S. C. and McMahon L. L. (2002) Pharmacological characterization of glycine-gated chloride currents recorded in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* **87**, 1515–1525.
- Clayton D. A. and Browning M. D. (2001) Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. *Neurobiol. Aging* **22**, 165–168.
- Clayton D. A., Mesches M. H., Alvarez E., Bickford P. C. and Browning M. D. (2002) A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fisher 344 rat. *J. Neurosci.* **22**, 362–3637.
- Eckles-smith K., Clayton D., Bickford P. and Browning M. D. (2000) Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Mol. Brain Res.* **78**, 154–162.
- Johnson J. W. and Ascher P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature (London)* **325**, 529–531.
- Kemp J. A. and Leeson J. A. (1993) The glycine site of the NMDA receptor—five years on. *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 20–25.
- Krasteniakov N. V., Martina M. and Bergeron R. (2005) Role of the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor in synaptic plasticity induced by pairing. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 2782–2792.
- Kuehl-Kovarik M. C., Magnusson K. R., Premkumar L. S. and Partin K. M. (2000) Electrophysiological analysis of NMDA receptor subunit changes in the aging mouse cortex. *Mech. Ageing Dev.* **115**, 39–59.
- Magnusson K. R. (2000) Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *J. Neurosci.* **20**, 1666–1674.
- Martin S. J., Grimwood P. D. and Morris R. G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Ann. Rev. Neurosci.* **23**, 649–711.
- Martina M., Krasteniakov N. V. and Bergeron R. (2003) D-serine differentially modulates NMDA receptor function in rat CA1 hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J. Physiol (Lond.)* **548**, 411–423.
- Miller R. F. (2004) D-serine as a glial modulator of nerve cells. *Glia* **47**, 275–283.
- Mori M., Gahwiler B. H. and Gerber U. (2002) β -alanine and taurine as endogenous agonist at glycine receptors in rat hippocampus *in vitro*. *J. Physiol. (Lond.)* **539**, 191–200.
- Mothet J. P., Parent A. T., Wolosker H., Brady R. O. Jr, Linden D. J., Ferris C. D., Rogawski M. A. and 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. USA* **97**, 4926–4931.
- Mothet J. P., Rouaud E., Sinet M. P., Potier B., Jouvenceau A., Dutar P., Videau C., Epelbaum J. and Billard J. M. (2006) A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell*, doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00216.x.
- Nagata Y., Uehara T., Kitamura Y., Nomura Y. and Horiike K. (1998) D-serine content and D-[³H] serine binding in the brain regions of the senescence-accelerated mouse. *Mech. Ageing Dev.* **104**, 115–124.
- Potier B., Poindessous-Jazat F., Dutar P. and Billard J. M. (2000) NMDA receptor activation in the aged rat hippocampus. *Exp. Gerontol.* **35**, 1185–1199.
- Priestley T., Laughton P., Myers J., Le Bourdelles B., Kerby J. and Whiting P. J. (1995) Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol. Pharmacol.* **48**, 841–848.
- Ramakers G. M., Urban I. J., De Graan P. N. E., Di Luca M., Cattabeni F. and Gispen W. H. (1993) The impaired long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus of cognitive deficient microencephalic rats is restored by D-serine. *Neuroscience* **54**, 49–60.
- Reynolds I. J., Murphy S. N. and Millar R. J. (1987) 3H-labeled MK-801 binding to the excitatory amino acid receptor complex from rat brain is enhanced by glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7744–7748.
- Rouaud E. and Billard J. M. (2003) D-cycloserine facilitates synaptic plasticity but impairs glutamatergic neurotransmission in rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 1051–1056.
- Schell M. J., Brady R. O., Molliver M. E. and Snyder S. H. (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J. Neurosci.* **17**, 1604–1615.

- Schell M. J., Molliver M. E. and Snyder S. H. (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 3948–3952.
- Shankar S., Teyler T. J. and Robbins N. (1998) Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampus of aged rats. *J. Neurophysiol.* **79**, 334–341.
- Silbernagl S., Völker K. and Dantzer W. H. (1999) D-serine is reabsorbed in rat renal pars recta. *Am. J. Physiol.* **276**, F857–F863.
- Thibault O. and Landfield P. W. (1996) Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* **272**, 1017–1020.
- Thibault O., Hadley R. and Landfield P. W. (2001) Elevated postsynaptic $[Ca^{2+}]$ and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **21**, 9744–9756.
- Tsai G. E., Yang P., Chung L. C., Tsai I. C., Tsai C. W. and Coyle J. T. (1999) D-serine added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* **156**, 1822–1825.
- Watanabe A. M. and O'Dell T. J. (2003) Age-related changes in theta frequency stimulation-induced long-term potentiation. *Neurobiol. Aging* **24**, 267–272.
- Watanabe Y., Himi T., Saito H. and Abe K. (1992) Involvement of glycine site associated with the NMDA receptor in hippocampal long-term potentiation and acquisition of spatial memory in rats. *Brain Res.* **582**, 58–64.
- Williams S. M., Diaz C. M., Macnab L. T., Sullivan R. K. and Pow D. V. (2006) Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons. *Glia* **53**, 401–411.
- Wolosker H., Blackshaw S. and Snyder S. H. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 13 409–13 414.
- Yang S., Qiao H., Wen L., Zhou W. W. and Zhang Y. (2005) D-serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8. *Neurosci. Lett.* **379**, 7–12.
- Yang Y., Ge W., Chen Y., Zhang Z., Shen W., Wu C. and Poo M. (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2100**, 15 194–15 199.

Résumé

Le cortex préfrontal (PFC) est le principal locus des perturbations dans l'activité des réseaux de neurones chez les schizophrènes. Ces perturbations résultent d'une dérégulation des interactions entre le système dopaminergique et le système glutamatergique dont l'origine demeure inconnue. Il est acquis que les cellules gliales détectent et intègrent les signaux synaptiques, et libèrent différentes substance neuroactives comme la D-sérine. Cet acide aminé est aujourd'hui reconnu comme le coagoniste endogène des récepteurs au glutamate de type NMDA dans de nombreuses aires cérébrales. Mon travail de thèse est centré sur le rôle de la D-sérine dans la transmission synaptique excitatrice glutamatergique dans le PFC du rongeur adulte et dans la gouvernance des interactions entre systèmes glutamatergiques et dopaminergiques. J'ai tout d'abord montré en utilisant des enregistrements électrophysiologiques sur tranches que la D-sérine est le coagoniste des récepteurs NMDA synaptiques dans les couches V/VI du PFC. Cet acide aminé est synthétisé par les astrocytes et contrôle l'induction de la potentialisation à long terme. D'autre part, j'ai montré que la dopamine exerce un effet biphasique sur l'activité des récepteurs NMDA synaptiques et sur l'excitabilité des neurones pyramidaux des couches V/VI du PFC et ce en contrôlant la libération de D-sérine. Une approche pharmacologique sélective a permis de mettre en évidence le rôle des récepteurs D1 dans les effets potentialisateurs et le rôle des récepteurs D2/D3 dans les effets inhibiteurs de la dopamine. Mon travail démontre que les astrocytes arborent des récepteurs à la dopamine qui contrôlent la libération de la D-sérine.

Mots clés : Astrocyte, cortex préfrontal, dopamine, D-sérine, glutamate, récepteur NMDA, schizophrénie, synapse,

Summary

The prefrontal cortex (PFC) is the main locus where dysfunctions of neuronal networks are evident in schizophrenia. These dysfunctions are caused by an impairment of cross-talk between dopaminergic and glutamatergic systems whose origin is unknown. It is now accepted that glia detect and integrate synaptic signals and then release many neuroactive substances such as D-serine. This amino acid is now considered to be the endogenous coagonist of the NMDA subtype receptors for glutamate in many brain areas. My PhD work focuses on the functions of D-serine in glutamatergic excitatory synaptic transmission in the PFC of adult rodent and in governing the interactions between dopaminergic and glutamatergic systems. First, using electrophysiological recordings on brain slices, I have shown that D-serine is the coagonist of synaptic NMDA receptors in layers V/VI of PFC. This amino acid is synthesized by glia and is crucial for the induction of long term potentiation. In addition, I have shown that dopamine has a bell-shape effect on the activity of synaptic NMDA receptors and on the excitability of excitatory pyramidal neurons by controlling the release of D-serine. The use of specific pharmacological tools allowed me to show the potentiating effects of dopamine are mediated by D1 receptors whereas the inhibitory effects are due to the activation of D2/D3 receptors. Finally, my work highlights the presence of functional dopaminergic receptors on astrocytes that modulate the release of D-serine in the PFC, thus impacting NMDA receptor activity.

Key words: Astrocyte, prefrontal cortex, dopamine, D-serine, glutamate, NMDA receptors, schizophrenia, synapse,