



HAL
open science

Étude de la régulation de la concentration extracellulaire de D-sérine et de son implication dans l'excitotoxicité

Caroline Maucler

► To cite this version:

Caroline Maucler. Étude de la régulation de la concentration extracellulaire de D-sérine et de son implication dans l'excitotoxicité. Neurosciences. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10041 . tel-01056463

HAL Id: tel-01056463

<https://theses.hal.science/tel-01056463>

Submitted on 20 Aug 2014

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

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

N° 41-2013

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE NEUROSCIENCES ET COGNITION

DIPLOME DE DOCTORAT

Soutenue publiquement le 4 Avril 2013

Par

Caroline MAUCLER

Titre

**Etude de la régulation de la concentration extracellulaire de
D-sérine et de son implication dans l'excitotoxicité.**

Directeur de thèse : M. Stéphane MARINESCO

Composition du jury

Mme Silvia SACCHI :	rapporteur
M. Jean Marie BILLARD :	rapporteur
M. Laurent BEZIN :	examineur
M. Lionel BERT :	examineur
M. Pierre PERNOT :	examineur
M. Bernard RENAUD :	président du jury
M. Stéphane MARINESCO :	directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. BERNARD

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

A Kevin, Catherine et Michel

Remerciements

Je remercie tout d'abord Mme Sylvia Sacchi, M. Jean Marie Billard, M. Laurent Bezin, M. Lionel Bert, M. Pierre Pernot et M. Bernard Renaud d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie tout particulièrement Stéphane Marinesco qui a dirigé mon travail de thèse et de master 2. J'ai énormément appris à tes côtés. Tu as toujours été disponible et à l'écoute.

Merci à Estelle et Yannick pour leur participation à ce travail.

Je remercie particulièrement Natalia, sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. On a partagé nos réussites, nos échecs, nos ras le bol...On s'est toujours soutenues et comprises, rendant ainsi les journées au labo bien plus agréables.

Merci à tous les membres de l'unité 1028 pour leur sympathie et leur accueil. Je remercie plus particulièrement Colette et Magali pour leur aide très précieuse ainsi qu'Aïcha. Merci à Aurore pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie également sur la plateforme Neurochem Anne, Gabriel et Sandrine.

Je remercie Jean Christophe Deloulme avec qui j'ai effectué mon premier stage en recherche. Tu m'as fait aimer la recherche et donné envie de continuer dans cette voie.

Je remercie mes parents grâce à qui j'ai pu arriver jusqu'ici. Merci de m'avoir toujours soutenue. Vous m'avez donné les moyens de faire ce que j'envisageais. Un merci tout particulier à ma mère pour avoir pris du temps pour relire mon manuscrit.

Merci également à Patrick et Renée pour leur accueil et leur attention pour que je puisse réussir pendant mon master 2.

Enfin je remercie Kevin qui m'a toujours soutenue et encouragée. Tu as toujours cru en moi et su me remotiver dans les moments de doute. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est également grâce à toi.

Résumé

La D-sérine, co-agoniste endogène du récepteur N-Méthyl D-Aspartate, est impliquée à la fois dans des fonctions physiologiques telles que l'apprentissage et le vieillissement et dans des pathologies psychiatriques et neurodégénératives comme la schizophrénie ou la sclérose latérale amyotrophique. Ce travail de thèse est composé de deux parties. Premièrement, je me suis intéressée aux mécanismes de régulation de la D-sérine extracellulaire. A l'aide de biocapteurs enzymatiques développés au laboratoire, nous avons évalué, *in vivo*, la diffusion de la D-sérine à travers la barrière hématoencéphalique et estimé sa concentration dans différents compartiments. Nous avons aussi montré que la recapture de la D-sérine est assurée par les transporteurs de type ASC et que sa dégradation est effectuée par la D-amino acide oxydase dans le cervelet et par la sérine racémase dans le cortex. Deuxièmement, j'ai étudié l'implication de la D-sérine dans le *status epilepticus*, un modèle présentant une forte excitotoxicité avérée. Nous avons tout d'abord développé une méthode de comptage automatique pour quantifier précisément la mort neuronale. Puis nous avons enregistré les concentrations de D-sérine et de glutamate extracellulaires lors du *status epilepticus* et nous avons montré que ces deux transmetteurs ont leur concentration augmentée dans le cortex piriforme/amygdale, zones fortement touchées par l'excitotoxicité. En revanche dans le cortex où il n'y a pas de perte neuronale excitotoxique, leur concentration reste inchangée. Mieux comprendre la régulation de la D-sérine et son rôle pathologique est essentiel pour développer et adapter des traitements.

Mots clés : *in vivo*, électrochimie, biocapteurs

Title : Regulation of the extracellular D-serine concentration in the brain and its implication in excitotoxicity.

Abstract

D-serine, an endogenous agonist of the N-methyl-D aspartate receptor, is implicated both in physiological functions like learning, aging and in psychiatric and neurodegenerative diseases like schizophrenia and amyotrophic lateral sclerosis. This thesis work is composed of two parts. First, I studied the mechanisms regulating D-serine extracellular concentration in the brain. With biosensors developed in the laboratory, we evaluated D-serine diffusion across the blood brain barrier and estimated its concentration in different compartments *in vivo*. We have shown that D-serine reuptake is mediated by ASC transporters and that its degradation relies on D-amino Acid oxidase in the cerebellum and on serine racemase in the cortex. Second, I have study the implication of D-serine in neuronal lesions produced by *status epilepticus*, a pathological model in which excitotoxicity is demonstrated. We have developed an automatic software to determine the density of neurons in a brain slice and identify the brain regions with most neuronal lesions following status epilepticus. We have then recorded the extracellular D-serine and glutamate concentration during *status epilepticus* and demonstrated

that the concentration of both transmitters is increased in piriform cortex/amygdala, area corresponding to extended excitotoxic neuronal death. However, in the cortex, an area without excitotoxic neuronal death, D-serine and glutamate concentration are constant. Understanding D-serine regulation and its pathological implication is essential to develop new treatment for protecting the neuronal tissue against excitotoxic insult.

Keywords : *in vivo*, electrochemistry, biosensors

Adresse du laboratoire

INSERM U1028-CNRS UMR 5292
Centre de recherche en neurosciences, Lyon
Equipe de physiologie intégrée du système d'éveil
8 avenue Rockefeller
69008 LYON cedex 08
France

Table des matières

Liste des abréviations.....	15
Liste des figures	17
I. Introduction générale	21
A. Régulation de la D-sérine	23
1. Synthèse de la D-sérine	23
1.1 Découverte de la sérine racémase	23
1.2 Description de la sérine racémase	24
1.3 Racémisation et α,β élimination	24
1.4 Localisation de la sérine racémase	25
1.5 Régulation de la sérine racémase	27
1.5.1 Activation	27
1.5.1.1 La sérine racémase dépend du phosphate de pyridoxal (PLP)	27
1.5.1.2 Les cofacteurs nécessaires à l'activation: les ions divalents et les nucléotides	28
1.5.1.3 Les protéines interagissant avec la sérine racémase : GRIP, Pick1, Golga3	28
1.5.2 Inhibition de l'activité de la sérine racémase	29
1.5.2.1 Rôle inhibiteur de la glycine et du L-aspartate	29
1.5.2.2 Inhibition par le monoxyde d'azote	29
1.5.2.3 Inhibition par les phospholipides, principalement le PIP ₂	30
1.5.2.4 Inhibition par la protéine kinase C	31
2. Dégradation de la D-sérine	31
2.1 Dégradation par la D-amino acide oxydase	31
2.1.1 Description	31
2.1.2 Localisation	32
2.2 Dégradation par la sérine racémase	33
3. Les mécanismes de libération et de recapture de la D-sérine	34
3.1 La libération	35
3.1.1 Libération de la D-sérine par exocytose dépendante du calcium	35
3.1.2 Par les transporteurs	35

3.2 La recapture	36
4. Hypothèse d'une navette de D-sérine entre les neurones et les astrocytes	36
B. Les récepteurs de la D-sérine	37
1. Le récepteur NMDA	37
1.1 Description	37
1.2 Expression des sous-unités	38
1.3 Localisation	39
1.4 D-sérine ou glycine, y a-t-il un co-agoniste prédominant ?	41
2. Le récepteur Gluδ2	43
C. Implications physiologiques de la D-sérine	44
1. Implication de la D-sérine dans le développement du système nerveux central	44
1.1 Implication dans la migration neuronale et la synaptogénèse	44
2. Implication dans la transmission synaptique, l'apprentissage et la mémorisation	45
3. Implication dans l'apoptose	47
4. Implication dans le vieillissement	48
D. Implications pathologiques de la D-sérine	49
1. L'excitotoxicité	50
1.1 Mécanismes de l'excitotoxicité	50
1.2 L'excitotoxicité est-elle déclenchée par l'implication préférentielle des récepteurs NMDA synaptiques ou extrasynaptiques	53
1.3 Antagonistes	56
1.4 Implication de la D-sérine dans l'excitotoxicité	58
2. Implications dans des pathologies neurodégénératives	58
2.1 Implication de la D-sérine dans la sclérose latérale amyotrophique	58
2.1.1 Description	58
2.1.2 Implication de la D-sérine et de ses enzymes de synthèse et de dégradation dans la SLA	59
2.2 Implication de la D-sérine dans la maladie d'Alzheimer	60
2.2.1 Description	60
2.2.2 Implication de la D-sérine	61
2.3 Implication de la D-sérine dans la maladie de Parkinson	62
2.3.1 Description	62

2.3.2 Implication de la D-sérine	62
2.4 Implication de la D-sérine dans l'épilepsie	63
2.4.1 Définition du <i>status epilepticus</i>	63
2.4.2 Implication de la D-sérine dans l'épilepsie et le <i>status epilepticus</i>	64
2.5 Implication de la D-sérine dans l'asphyxie périnatale	65
3. Implication de la D-sérine dans la schizophrénie	66
3.1 Description	66
3.2 Des mesures de la concentration de D-sérine contradictoires	67
3.3 Implication de la sérine racémase	67
3.4 Implication de la D-amino acide oxydase	68
3.5 Implication génétique	68
3.6 Traitements	70
E. Hypothèses de travail et objectifs	72
II. Techniques	75
A. Les biocapteurs Enzymatiques	77
1. Principe général d'un biocapteur	77
2. Les biocapteurs enzymatiques	77
2.1 Biocapteurs à D-sérine	79
2.2 Biocapteurs à glutamate	79
2.3 Biocapteurs contrôles	80
3. Acquisition	80
4. Calibration des biocapteurs enzymatiques	80
B. Principe de l'immunofluorescence et détection	80
1. Importance du choix du marqueur utilisé pour quantifier la mort neuronale	80
2. Principe de l'immunofluorescence	81
2.1 Les fluorochromes	81
2.2 Marquages immunofluorescents sur tranche de cerveau	82
3. Détection de l'immunofluorescence : Le microscope confocal	82
3.1 Principe général	82
3.2 Convention de couleur	83
4. le choix du seuillage, étape déterminante de l'analyse d'image	84

III. Régulation de la D-sérine <i>in vivo</i>	85
Chapitre 1	87
D-Serine diffusion through the blood-brain barrier: effect on D-serine compartmentalization and storage	87
Chapitre 2	107
<i>In vivo</i> D-serine Hetero-Exchange Through Alanine-Serine-Cysteine (ASC) Transporters Detected By Microelectrode Biosensors	107
Chapitre 3	127
<i>In vivo</i> degradation of D-serine in the Central Nervous System depends on D-Amino Acid Oxidase and serine racemase	127
IV. Implication physiopathologique de la D-sérine	143
Chapitre 4	145
Neuronal loss after <i>status epilepticus</i> in rats evidenced by an automatic immunohistochemical quantification of neuronal density	145
Chapitre 5	161
Implication de la D-sérine et du glutamate dans le <i>status epilepticus</i> chez le rat vigile ...	161
Conclusion et perspectives	173
Références bibliographiques	179

Liste des abréviations

A β : peptide beta amyloïde

AIF : Facteur d'Induction de l'apoptose

APP : précurseur de la protéine amyloïde

Asc : Alanine serine cystéine

ASCT : Alanine Sérine Cystéine Thréonine

ADP : Adénosine di-phosphate

ATP : Adénosine tri-phosphate

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

BSA : Bovine Serum Albumine

CaMKII : calmoduline kinase II

CREB : cAMP response element-binding protein

DAAO : D-amino acide oxydase

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

EEG : Electro Encéphalogramme

EPSC : courant d'excitation post-synaptique

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

K_i : constante d'inhibition

KO : Knock out

LTD : Dépression à long terme

LTP : Potentiation à long terme

Mg²⁺ : ion magnésium

NMDA : N-Methyl-D-Aspartate

NO : monoxyde d'azote

NOS : Nitric Oxide Synthase

PFA : Paraformaldéhyde

PB : Phosphate Buffer

PBS : Phosphate Buffer Saline

PBST : Phosphate Buffer Saline + Tween 20

PCP : phencyclidine

PICK1: Protein interactiong with C kinase 1

PKC : Protéine kinase C

PLP : phosphate 5' pyridoxal

PPD : Poly-*m*-phénylenediamine

RgDAAO : *Rhodotorula gracilis* D-amino acide oxydase

RT-PCR : réaction en chaine par polymérase par transcription inverse

SE : *status epilepticus*

SOD1: superoxyde Dismutase 1

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SNC : Système Nerveux Central

SR : Sérine Racémase

Tunel : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling

Liste des figures

Introduction générale

Tableau 1 : Tableau de comparaison des propriétés cinétiques de la sérine racémase murine et humaine	24
Figure 1 : Réaction de racémisation et d' α,β élimination	25
Figure 2 : Localisation de la sérine racémase et de la D-sérine dans le cerveau de souris adultes	27
Figure 3 : Modèles des régulations possibles de la synthèse de D-sérine par inhibition de la sérine racémase	30
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des régulateurs positifs et négatifs de l'activité de la sérine racémase	31
Tableau 3 : Expression de la concentration de D-sérine et de l'activité de la DAAO dans différentes structures du cerveau de souris à différents stades du développement postnatal	32
Figure 4 : La navette de la D-sérine et de la L-sérine entre les neurones et les astrocytes	37
Figure 5 : Représentation schématique du récepteur NMDA	37
Figure 6 : Modulation de la localisation des récepteurs NMDA à la membrane plasmique ..	40
Figure 7 : Coupe de cerveau de rats à P21 avec un marquage spécifique de la D-sérine, du récepteur NR2A/B et de la glycine	42
Figure 8 : Modèle de la régulation de la migration des cellules granulaires du cervelet par la D-sérine et le glutamate.....	45
Figure 9 : Schéma récapitulatif des mécanismes de l'excitotoxicité	53
Figure 10 : Schéma des effets opposés des récepteurs NMDA	55
Figure 11 : Les voies de neuroprotection activées par les récepteurs NMDA synaptiques	55
Figure 12 : Schéma des voies de signalisation activées et inhibées par l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques	56
Figure 13 : Hypothèse du rôle de la DAAO et pLG72 sur la disponibilité de la D-sérine lors de conditions normales ou pathologiques	69
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des différentes études cliniques utilisant de la D-sérine pour traiter la schizophrénie	71

Techniques

Figure 1 : Schéma d'un biocapteur	78
--	----

Figure 2 : Principe général d'un biocapteur enzymatique	78
Figure 3 : Réaction enzymatique permettant la détection de D-sérine	79
Figure 4 : Réaction enzymatique permettant la détection du glutamate	79
Figure 5 : Schéma du principe de l'immunofluorescence.....	81
Figure 6 : Schéma du principe de la confocalité.....	83
Figure 7 : Exemple du seuillage d'une image de cortex de rat ..	84

Chapitre 1

Figure 1 : Basal D-serine levels in the rat brain.....	96
Figure 2 : Extracellular D-serine after i.p. administration	98
Figure 3 : Serum D-serine after i.p. administration	98
Figure 4 : Total D-serine in brain homogenates.....	99
Figure 5 : Brain D-serine compartmentalization before and after i.p. administration	100

Chapitre 2

Figure 1 : Identification of a D-serine reuptake mechanism <i>in vivo</i>	115
Figure 2 : Small neutral amino acids interfere with D-serine reuptake.	117
Figure 3 : Asc-1 and ASCT2 contribute to D-serine reuptake.....	118
Figure 4 : D-Serine release evoked by local infusion of small neutral amino acids.	119
Figure 5 : Asc-1 but not ASCT2 contribute to D-serine release	122
Figure 6 : TTX increases D-serine concentration via an ASC transporter-dependent mechanism	123
Figure 7 : Schematic representation of D-serine transport mechanisms through Asc-1 and ASCT2 transporters.	125

Chapitre 3

Figure 1 : An <i>ex vivo</i> assay for DAAO activity	134
---	-----

Figure 2 : Inhibition of D-amino acid oxidase by benzoate.....	135
Figure 3 : An <i>ex vivo</i> assay for serine racemase and α,β eliminase activity.	136
Figure 4: D-Amino Acid Oxidase degraded extracellular D-serine in the cerebellum but not in the frontal cortex.	138
Figure 5 : D-serine degradation by serine racemase in the frontal cortex..	139

Chapitre 4

Figure 1 : Schematic representation of neuronal density quantification on a single optical section.....	151
Figure 2 : Confirmation of neuronal nuclei on adjacent optical sections..	154
Figure 3 : Quantification of neuronal density in the piriform cortex, amygdala, somatosensory cortex and thalamus.....	155
Figure 4 : Quantification of neuronal density in the hippocampal formation CA3, CA1, hilus and dentate gyrus.....	157

Chapitre 5

Figure 1 : Quantification de la mort neuronal après une injection d'un antagoniste des récepteurs NMDA : le MK-801.....	168
Figure 2 : Enregistrement des concentrations extracellulaires de D-serine et de glutamate dans le cortex pariétal.....	169
Figure 3 : Enregistrement des concentrations extracellulaires de D-serine et de glutamate dans le cortex piriforme/amygdale... ..	170

Conclusion et perspectives

Figure 1 : Schéma récapitulatif de la régulation de la D-sérine extracellulaire.	176
--	-----

I. Introduction générale

Dans cette introduction seront présentés tout d'abord la D-sérine et ses différents systèmes de régulation dans le système nerveux central. Ensuite ses implications physiologiques et pathologiques seront décrites, pour terminer avec les objectifs de ce travail de thèse.

Les acides aminés naturels sont utilisés par le cerveau des mammifères et la plupart d'entre eux sont présents sous la forme lévogyre. La forme symétrique, dextrogyre, était considérée comme restreinte aux bactéries et non naturelle dans les tissus eucaryotes (Corrigan, 1969). Au début des années 90, la D-sérine a été pour la première fois identifiée dans le cerveau de rats. De fortes concentrations ont été quantifiées à des niveaux comparables à celles trouvées pour les neurotransmetteurs classiques (Hashimoto et al., 1992a). Elle n'est pas uniquement présente dans le cerveau mais également dans différents organes périphériques tels que le foie, la rate, les reins, le pancréas, le cœur, les poumons (Horio et al., 2011). La D-sérine et le D-aspartate sont les deux D-amino acides les plus abondants (Dunlop et al., 1986). Les récents progrès dans les techniques d'analyses ont permis de certifier la présence des D-amino acides chez les mammifères, notamment chez les humains (Kirschner and Green, 2009, Miyoshi et al., 2012). Cette découverte a amené les chercheurs à reconsidérer la place des D-amino acides chez les mammifères. Une question majeure a été de déterminer si la D-sérine cérébrale a une origine exogène ou endogène. Son origine a été au départ envisagée dans l'alimentation ou par production bactérienne au niveau de la flore intestinale. Ces deux hypothèses ont été réfutées. Dunlop and Neidle (1997) ont démontré à l'aide de D-sérine radiomarkée que la D-sérine cérébrale ne provient pas de l'alimentation. Nagata et al. (1994) ont comparé la quantité de D-sérine cérébrale chez des souris contrôles et chez des souris sans bactéries et ils n'ont trouvé aucune différence. Par leurs expériences Dunlop and Neidle (1997) démontrent que la D-sérine cérébrale a une origine cérébrale et que son précurseur est la L-sérine. Wolosker et al. (1999b) confirment cela en identifiant l'enzyme responsable de sa synthèse dans le système nerveux central.

La D-sérine est de nos jours définie comme un neuromodulateur jouant un rôle majeur dans le système nerveux central (SNC). Elle a été identifiée comme co-agoniste des récepteurs NMDA par sa fixation sur le site NR1, plus connu comme site de fixation de la glycine. Depuis sa découverte dans le cerveau des mammifères, plusieurs équipes se sont intéressées à la régulation de la D-sérine. Comment est-elle synthétisée, dégradée ? Existe-t-il des mécanismes de recapture et de libération de la D-sérine ? Est-elle impliquée dans des fonctions physiologiques et/ou pathologiques ?

A. Régulation de la D-sérine

La concentration de D-sérine est régulée à la fois par sa synthèse, sa dégradation mais également par des mécanismes contrôlant sa libération et sa recapture.

1. Synthèse de la D-sérine

1.1 Découverte de la Sérine Racémase

Plusieurs phénomènes observés chez le rat et la souris suggéraient l'existence d'une enzyme synthétisant de la D-sérine à partir de la L-sérine: (a) la concentration de D-sérine est

plus élevée lorsque la concentration de L-sérine est augmentée (Takahashi et al., 1997). (b) Dunlop and Neidle (1997) ont montré que le précurseur direct de la D-sérine est la L-sérine et que le ratio de production est d'environ 4% par heure. L'enzyme responsable de ces réactions était alors encore inconnue. La sérine racémase a été identifiée en premier par H. Wolosker en 1999. Grâce à des techniques de purifications biochimiques, l'enzyme a été purifiée, isolée et clonée à partir d'extrait de cerveau de rat (Wolosker et al., 1999a, Wolosker et al., 1999b). Quelques années plus tard, après avoir purifié la sérine racémase murine, l'équipe de H. Wolosker a purifié la sérine racémase humaine (De Miranda et al., 2000).

1.2 Description de la sérine racémase

La sérine racémase fait partie de la famille des enzymes dépendantes d'un cofacteur, le phosphate 5' pyridoxal (PLP). La sérine racémase de souris (mSR) a une masse moléculaire de 36.3kDa. Elle est composée de 319 acides aminés. La sérine racémase humaine (hSR) est à 88% identique à celle de souris et composée de 340 acides aminés. Présente sous forme d'homodimère en solution, elle a son optimum d'activité à un pH de 8.5 et à la température de 37°C (Wolosker et al., 1999b, De Miranda et al., 2000). La sérine racémase a la particularité de pouvoir faire une réaction de racémisation qui est la production de D-sérine à partir de L-sérine mais également d' α,β élimination qui est la production de pyruvate et d'ammonium à partir de L- ou D-sérine. La sérine racémase humaine et la sérine racémase de souris ont quasiment la même affinité pour la D-sérine concernant la racémisation ($4,1 \pm 0,2$ mM et $3,8 \pm 0,1$ mM respectivement) et la même affinité concernant la L-sérine pour l' α,β élimination ($4,7 \pm 0,4$ mM et $4,0 \pm 0,5$ mM respectivement, Tableau 1).

	mSR			hSR		
	V_{\max} (min^{-1})	K_m (mM)	V_{\max}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	V_{\max} (min^{-1})	K_m (mM)	V_{\max}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Racemization reaction						
L-sérine \rightarrow D-sérine	45.5 ± 0.5	3.8 ± 0.1	12.0 ± 0.4	41.5 ± 1.5	4.1 ± 0.2	10.0 ± 0.8
α,β-Elimination reaction						
L-serine \rightarrow pyruvate	81.3 ± 0.8	4.0 ± 0.5	20.3 ± 2.6	100 ± 5.1	4.7 ± 0.4	21.2 ± 2.7

Tableau 1 : Tableau de comparaison des propriétés cinétiques de la sérine racémase murine et humaine. mSR : sérine racémase murine. hSR : sérine racémase humaine. D'après Pollegioni and Sacchi (2010).

1.3 Racémisation et α,β élimination

Au départ, seule l'activité de racémisation de l'enzyme fut étudiée. En cherchant à déterminer les cofacteurs nécessaires, De Miranda et al. (2002) se sont aperçu qu'à partir de 4 molécules de L-sérine, il y avait production de seulement 1 molécule de D-sérine. Selon leurs conditions expérimentales, cette différence ne pouvait pas être due à une dégradation de la D-

sérine produite. Ils ont ainsi découvert que la sérine racémase est une enzyme bifonctionnelle. Pour 4 molécules de L-sérine consommées, il y a production par la sérine racémase d'une molécule de D-sérine et de 3 molécules de pyruvate. La synthèse de pyruvate par la sérine racémase relie la synthèse de D-sérine au métabolisme énergétique de la cellule. Le pyruvate peut être soit utilisé par le cycle des acides tricarboxyliques dans les mitochondries, soit converti en lactate utilisé comme substrat énergétique par les neurones lors de forts besoins en énergie.

La L-sérine-O-sulfate, un dérivé de la L-sérine peut être α,β éliminée et produire du pyruvate mais elle ne peut pas être racémisée. Cette réaction permet d'inhiber de manière compétitive la formation de D-sérine par la racémisation de la L-sérine (Panizzutti et al., 2001).

La sérine racémase possède donc plusieurs propriétés :

- Elle est responsable de la racémisation de la D-sérine à partir de L-sérine.
- Elle possède également une activité d' α,β élimination qui permet la production de pyruvate à partir de L-sérine (Figure 1).

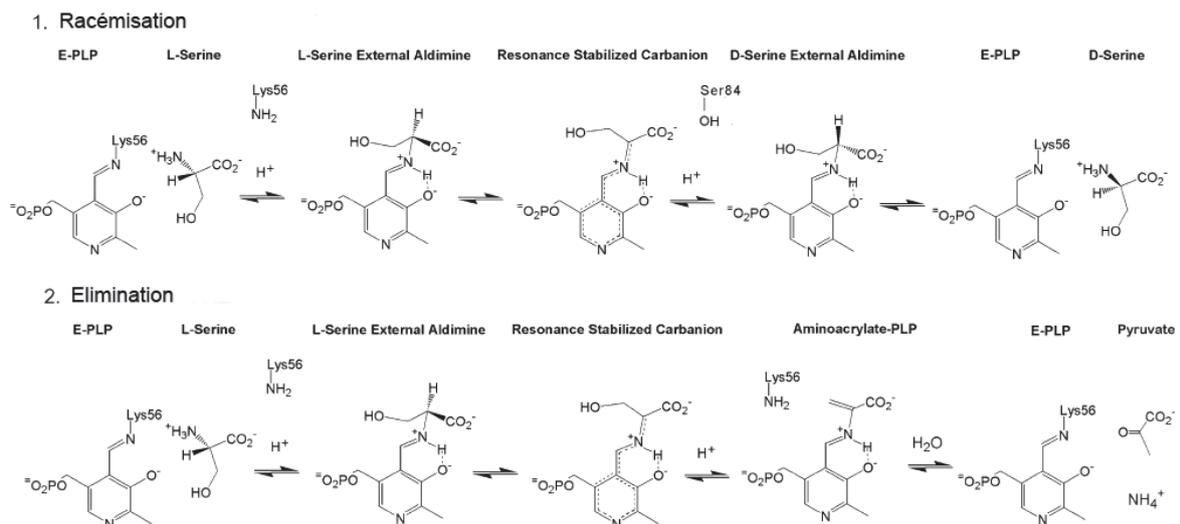


Figure 1 : Réaction de racémisation et d' α,β élimination.

La L-sérine réagit avec la sérine racémase (E) associée au pyridoxal 5' phosphate (PLP). Puis il y a formation d'un carbanion stabilisé par résonance. A partir de cette étape, deux réactions peuvent avoir lieu, soit la racémisation qui permet la production de D-sérine. Soit l' α,β élimination qui permet la production de pyruvate et de l'ion ammonium (Wolosker and Mori, 2012).

1.4 Localisation de la sérine racémase

La localisation de la sérine racémase et de la synthèse de la D-sérine est soumise à de nombreux débats. Des marquages immunohistochimiques ont localisé la sérine racémase principalement dans le télencéphale dans des régions comme le bulbe olfactif, le cortex, le striatum ou l'hippocampe. La sérine racémase est absente du cervelet et du tronc cérébral

(Miya et al., 2008). Sa localisation est quasiment identique à celle de la D-sérine (Figure 2), (Schell et al., 1997).

Bien que la localisation anatomique de la sérine racémase soit nettement définie, concernant sa localisation cellulaire, les données ne sont pas aussi claires. Les études initiales ont localisé la sérine racémase dans les astrocytes au niveau du système nerveux central (Wolosker et al., 1999a) et dans les cellules de Schwann pour le système nerveux périphérique (Wu et al., 2004). En 2006, Kartvelishvily et al. (2006) ont démontré que la sérine racémase est située également dans les neurones. Cette différence de résultat s'explique par un changement de la technique de fixation du cerveau et de l'anticorps utilisé. L'anticorps anti sérine racémase utilisé initialement avait pour indication de ne pas réagir sur coupe fixée au paraformaldéhyde mais uniquement sur coupe fixée au méthanol. Le problème est que la fixation au méthanol provoque la précipitation des protéines et peut générer des artéfacts dus au rétrécissement du cytoplasme et à la modification de la morphologie des cellules. Cette technique pourrait avoir affectée l'antigénicité de la sérine racémase et empêcher l'observation de son marquage neuronal. L'utilisation d'un nouvel anticorps approprié pour la fixation au paraformaldéhyde a permis de détecter la sérine racémase dans les neurones à des niveaux comparables ou supérieurs à ceux trouvés dans les cellules gliales. Seulement une faible immunoréactivité est observée dans les astrocytes. Des études d'hybridation *in situ* sur des cultures primaires de neurones de rats (Yoshikawa et al., 2006) puis sur coupes de cerveaux de rats confirment la localisation prédominante de la sérine racémase dans les neurones (Yoshikawa et al., 2007). Plus récemment, Miya et al. (2008) ont apporté une preuve supplémentaire de la localisation neuronale de la sérine racémase. Pour eux, la sérine racémase est exclusivement neuronale et non astrocytaire. Un des points forts de leur étude est l'utilisation de souris knock-out (KO) pour la sérine racémase comme contrôle négatif. A l'aide de marquages immunohistochimiques *in vivo*, sur tranches de cerveaux de rats, ils ont montré une colocalisation de la sérine racémase et de NeuN, un marqueur spécifique des neurones. En revanche, la sérine racémase n'est pas colocalisée avec la GFAP, un marqueur astrocytaire. Dans cette étude, un point intéressant est développé : *in vivo* la sérine racémase n'est pas astrocytaire, en revanche *in vitro*, sur cultures de cellules, elle est colocalisée avec la GFAP. Ils supposent que les conditions expérimentales des cultures peuvent affecter l'expression de la sérine racémase dans le cerveau. Des contrôles *in vivo* se révèlent nécessaires pour confirmer les études sur cultures de cellules. Benneyworth et al. (2012) ont également démontré une localisation prédominante de la sérine racémase dans les neurones glutamatergiques à l'aide de souris KO pour la sérine racémase.

Des études menées pour étudier le rôle de la D-sérine dans des pathologies comme la sclérose latérale amyotrophique (SLA), Alzheimer, Parkinson ou l'épilepsie localisent la sérine racémase soit uniquement dans des cellules non neuronales comme les astrocytes et la microglie (Wu et al., 2004, Sasabe et al., 2007, Ryu et al., 2010), soit dans les neurones et les astrocytes (Lu et al., 2011). Ces résultats sont surprenants par rapport aux résultats situant la sérine racémase comme prédominante dans les neurones (Kartvelishvily et al., 2006, Yoshikawa et al., 2007, Miya et al., 2008, Benneyworth et al., 2012). Un premier facteur pouvant expliquer cette localisation est la non prise en compte des données sur la localisation neuronale bien que les articles soient plus récents (Sasabe et al., 2007, Ryu et al., 2010) ou du fait de leur antériorité (Wu et al., 2004). Un second facteur peut être les conditions de cultures

cellulaires influençant l'expression de la sérine racémase (Wu et al., 2004, Sasabe et al., 2007, Wu et al., 2007). Un troisième facteur plus hypothétique peut être un dysfonctionnement provoquant la présence de la sérine racémase dans les cellules non neuronales en conditions pathologiques (Lu et al., 2011).

Toutes ces études indiquent que la synthèse de D-sérine par la sérine racémase est majoritairement neuronale. En revanche, les conditions de son expression astrocytaire restent à préciser. Sont-elles physiologiques, dues à des conditions pathologiques ou aux conditions de cultures cellulaires ?

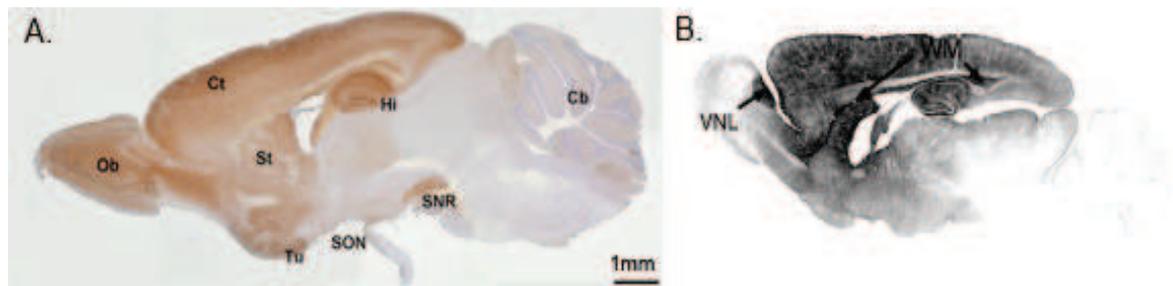


Figure 2 : Localisation de la sérine racémase et de la D-sérine dans le cerveau de souris adultes.

A. Marquage immunohistochimique de la sérine racémase sur tranche de cerveau de souris adultes (P56). Ob : bulbe olfactif, Ct : cortex ; St : striatum; Hi : hippocampe ; SNR : substance noire pars réticula ; SNR : noyau supra optique, TU : tubercule olfactif ; Cb : cervelet. (Miya et al., 2008).
B. Marquage immunohistochimique de la d-sérine sur tranche de cerveau de rat adulte (P21).

1.5 Régulation de la sérine racémase

L'activité de la sérine racémase peut être régulée de plusieurs façons différentes. Selon les interactions avec différents cofacteurs ou partenaires protéiques, l'activité de la sérine racémase peut être soit augmentée, soit inhibée.

1.5.1 Activation

1.5.1.1 La sérine racémase dépend du phosphate de pyridoxal (PLP)

Deux types de racémases ont été identifiés jusqu'à maintenant, celles ne dépendant d'aucun cofacteur et celles nécessitant le phosphate 5' pyridoxal (PLP) qui est un dérivé de la vitamine B6. La sérine racémase fait partie de la famille des enzymes dont l'activation nécessite la fixation du PLP. Sur la base de leurs structures 3D, les enzymes dépendantes du PLP sont classées en cinq types qui ont évolué à partir de trois protéines ancestrales différentes. La sérine racémase des mammifères appartient au type II caractérisé par une liaison du PLP au domaine C-terminal. (Yoshimura and Goto, 2008, Rattka et al., 2012).

1.5.1.2 Les cofacteurs nécessaires à l'activation : les ions divalents et les nucléotides

Des études sur la sérine racémase recombinante de souris exprimée dans des cellules HEK93 ont démontré que l'ion magnésium (Mg^{2+}) et l'ADP/ATP sont les cofacteurs physiologiques de l'enzyme. La vitesse des réactions de racémisation et d' α,β élimination de la L-sérine est multipliée entre 5 et 10 fois par la présence de Mg^{2+} et d'ATP. L'activité de l'enzyme est indépendamment stimulée par le Mg^{2+} et l'ATP. En effet, l'ATP peut augmenter l'activité de l'enzyme en présence d'Acide Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA), un chélateur de cations divalents. Les concentrations nécessaires de chaque cofacteur seul pour activer l'enzyme sont diminuées d'environ 100 fois lorsque les deux cofacteurs sont présents. Les effets dus au Mg^{2+} et à l'ATP sont additifs, suggérant un rôle pour un complexe Mg-ATP dans l'activation de la sérine racémase (De Miranda et al., 2002). L'équipe de Rodriguez-Crespo a réalisé une étude cristallographique de la structure de la sérine racémase de *Schizosaccharomyces pombe* et *Thermus thermophilus* et a modélisé la structure de la sérine racémase humaine à partir des résultats obtenus. Ils ont montré que le site de fixation des cations est en premier occupé par le Mg^{2+} et en second par le Ca^{2+} . D'après leur étude, les sites de fixation du Mg^{2+} et de l'ATP sont distincts, infirmant ainsi la possibilité de la formation d'un complexe Mg-ATP (Baumgart et al., 2007).

1.5.1.3 Les protéines interagissant avec la sérine racémase : GRIP, Pick1, Golga3

La sérine racémase peut être régulée par des interactions protéine-protéine. Trois partenaires ont été identifiés pour interagir avec la sérine racémase. Les sérines racémases humaine et murine possèdent une séquence consensus pour se lier aux domaines PSD95/disc large/ZO-1 (PDZ). Les protéines GRIP et PICK1 (Protein interacting with C kinase 1) peuvent interagir avec la sérine racémase par leurs domaines PDZ.

La sérine racémase se lie à PICK1 par son domaine PDZ et PICK1 interagit avec la protéine kinase C (PKC). Il n'y a pas de données concernant les effets de la liaison de PICK1 sur l'activité de la sérine racémase. Des données ont seulement été obtenues chez des souris knock-out pour la protéine PICK1. Cette délétion induit une diminution des niveaux de D-sérine dans le télencéphale de souris nouveaux nés. Ces résultats montrent que PICK1 peut réguler les mécanismes de synthèse de la D-sérine, en revanche les voies de signalisation ou les interactions mises en jeu pour y parvenir ne sont pas encore connues (Hikida et al., 2008).

La sérine racémase se lie au domaine PDZ-6 de la protéine GRIP par son domaine de liaison C-terminal et est activée par cette interaction. GRIP peut également se lier aux récepteurs AMPA par ses domaines PDZ-4 et PDZ-5. Kim et al. (2005) ont montré que la phosphorylation des récepteurs AMPA par le glutamate induit une dissociation de GRIP et des récepteurs AMPA. Cela a pour conséquences la liaison de GRIP à la sérine racémase et une augmentation de la production de D-sérine. Pour Baumgart et al. (2007), la liaison au domaine PDZ-6 n'est pas suffisante pour activer la sérine racémase. Ces auteurs montrent

que les domaines PDZ-6, PDZ-7 et le segment de liaison entre les deux sont nécessaires à l'activation totale de la sérine racémase *in vitro* et *in vivo*.

La troisième protéine à interagir avec la sérine racémase est Golga3. Golga3 est aussi connue sous le nom de GCP170 ou golgine160 et est liée à la face cytosolique de l'appareil de golgi. Golga3 se lie à la sérine racémase à la fois *in vitro* et *in vivo*. Golga3 permet d'augmenter considérablement les niveaux de sérine racémase en diminuant son ubiquitination et donc sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Dumin et al., 2006). Ce mécanisme permet une modulation de la production de D-sérine.

1.5.2 Inhibition de l'activité de la sérine racémase

1.5.2.1 Rôle inhibiteur de la glycine et du L-aspartate

La glycine, bien que plus petite que la L-sérine et avec un groupe hydroxyle en moins, peut inhiber fortement la formation de D-sérine à partir de son L-isomère. Bien que les constantes d'inhibition trouvées ne sont pas les mêmes, 0.15mM pour l'équipe de A. Neidle et de 1.63mM pour celle de J. Konvalinka, ces deux équipes sont d'accord pour dire que la glycine est un inhibiteur compétitif de la L-sérine (Wolf et al., 1996, Dunlop and Neidle, 2005). D.S. Dunlop et A. Neidle ont également trouvé que le L-glutamate inhibe la sérine racémase de 10%, le L-aspartate à 47% et l'acide homocystéique à 41% tandis que les D-isomères n'influencent pas son activité. La L-asparagine inhibe à 62% la sérine racémase et l'acide oxaloacétique à 44%. Parmi ces composés, seul le L-aspartate est susceptible d'avoir le plus gros effet inhibiteur *in vivo* car sa constante d'inhibition ($K_i = 1.9\text{mM}$) est proche de sa concentration dans le cerveau. Tout comme la glycine, le L-aspartate est un inhibiteur compétitif de la sérine racémase. Panizzutti et al. (2001) ont pour leur part trouvé que la L-lysine et la L-cystéine inhibaient significativement la sérine racémase par une interaction avec le PLP et contrairement à D.S. Dunlop et A. Neidle que la D-cystéine est un D-amino acide inhibiteur.

On peut supposer qu'*in vivo*, la concentration de glycine (entre 3 et 6 mM) dans les astrocytes peut jouer un rôle dans la synthèse de la D-sérine, si la localisation astrocytaire de la sérine racémase est confirmée.

1.5.2.2 Inhibition par le monoxyde d'azote

L'équipe de Suzuki a démontré sur des lignées de glioblastomes qu'en présence d'un donneur de monoxyde d'azote (NO), la sérine racémase est inhibée. L'activité de la sérine racémase est inversement régulée par la D-sérine et le NO (Shoji et al., 2006). L'équipe de S. Snyder a montré que lorsque la sérine racémase est physiologiquement S-nitrosylée, cela conduit à son inhibition. Le glutamate et la D-sérine se fixent sur les récepteurs NMDA post-synaptique. Le calcium se lie alors à la calmoduline qui est associée à la nNOS et stimule la production de NO qui va ensuite diffuser dans les astrocytes et les neurones adjacents pour nitrosyler et inhiber la sérine racémase. Une boucle de rétrocontrôle négatif est donc mise en place pour diminuer la production de D-sérine après l'activation des récepteurs NMDA (Mustafa et al., 2007) (Figure 3A).

1.5.2.3 Inhibition par les phospholipides, principalement le PIP₂

L'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate permet l'activation de la sérine racémase. Mustafa et al. (2009) ont ajouté de la dyhydroxyphenylglycine (DHPG), un agoniste des récepteurs mGluR5, sur cultures d'astrocytes et ils ont observé une multiplication par quatre de la concentration de la D-sérine. Ils proposent un modèle où lorsque le neurone présynaptique libère du glutamate, celui-ci ne se fixe pas uniquement sur les récepteurs post-synaptiques mais aussi sur les récepteurs mGluR5 situés sur les astrocytes de la synapse tripartite. L'activation des récepteurs mGluR5 active la PLC qui va dégrader le PIP₂ et libérer la sérine racémase de la membrane plasmique. Le PIP₂ inhibe l'activité de la sérine racémase en la maintenant inactive à la membrane plasmique (Figure 3B).

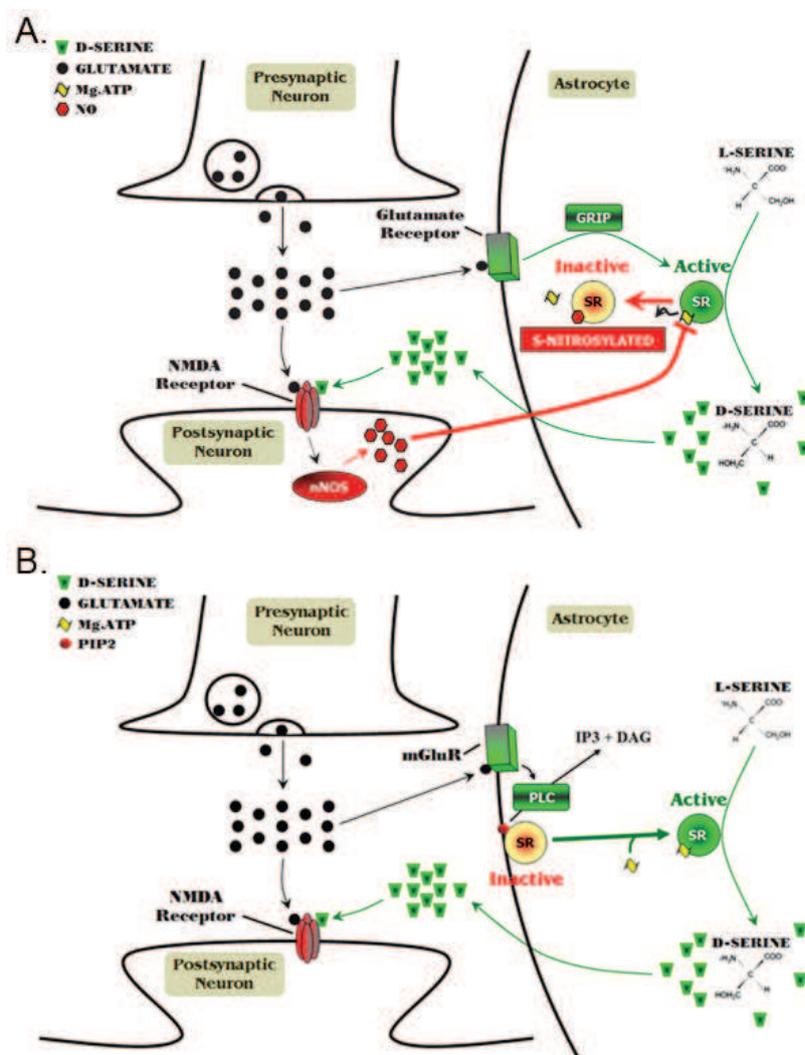


Figure 3 : Modèles des régulations possibles de la synthèse de D-sérine par inhibition de la sérine racémase.

A. Inhibition de la sérine racémase par S-nitrosylation. B. Inhibition de la sérine racémase par liaison avec le PIP₂.

1.5.2.4 Inhibition par la protéine kinase C

PICK1 peut interagir avec la protéine kinase C (PKC) et l'adresser à ses cibles dans les cellules. L'équipe de R. Panizzutti a démontré que la PKC peut phosphoryler la sérine racémase et contrôler les niveaux de D-sérine à la fois *in vitro* et *in vivo*. La sérine racémase est physiologiquement phosphorylée par la PKC dans les astrocytes et les neurones, cela conduisant à une diminution de son activité et donc des niveaux de D-sérine dans le cerveau (Vargas-Lopes et al., 2011).

D'après ces résultats et ceux obtenus précédemment : a) chez des souris knock-out pour la protéine PICK1, une diminution des niveaux de D-sérine dans le télencéphale de souris nouveaux nés est observée. b) PICK1 peut interagir avec la PKC et l'adresser à ses cibles dans les cellules. On peut supposer que PICK1 peut bloquer la phosphorylation de la sérine racémase par la PKC en se liant à elle. On peut également imaginer un trio où PICK1 est liée à la fois à la sérine racémase et à la PKC, empêchant ainsi la PKC et la sérine racémase de se rencontrer. Lorsque PICK1 est absente, la PKC n'a plus de modulateur et phosphoryle en excès la sérine racémase.

Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs
PLP	Glycine
Mg ²⁺	L-aspartate
ATP	NO
GRIP	PIP ₂
PICK1	L-lysine
Golga3	L-D cystéine
	PKC

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des régulateurs positifs et négatifs de l'activité de la sérine racémase.

2. Dégradation de la D-sérine

2.1 Dégradation par la D-amino acide oxydase

2.1.1 Description

La D-amino acide oxydase (DAAO) a été découverte en 1935 par Krebs qui fit l'observation que les acides aminés dextrogyres étaient désaminés plus vite que leurs isomères naturels à partir de reins de porc et d'homogénats de foie. La DAAO est une enzyme dépendante du dinucléotide flavine adénine (FAD). Elle catalyse spécifiquement la déamination des D-amino acides. Cette déamination produit un α -kétacide et de l'ammoniac avec une réduction concomitante de 2 électrons du cofacteur, la FAD. La DAAO est présente dans de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes, allant de la levure aux mammifères. La DAAO de reins de cochon a été la première purifiée en 1973 tandis que la seconde l'a été

14 ans plus tard chez la levure *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO). Un peu plus tard, la DAAO a également été caractérisée chez une autre levure, la *Trigonopsis variabilis* (Pilone, 2000). La DAAO humaine a été isolée plus tardivement, en 1988 (Bergersen et al., 2012).

2.1.2 Localisation

La DAAO est fortement exprimée dans le foie et les reins de mammifères. La DAAO a été également identifiée dans le cerveau de souris et de rats où elle est principalement présente et active dans le tronc cérébral et le cervelet (Schell et al., 1995, Loss et al., 2012). De l'activité enzymatique a aussi été observée dans la matière grise du bulbe rachidien et de la moelle épinière thoracique. Il n'y a pas d'activité de la DAAO détectable dans le cortex et le striatum ni pendant le développement ni à l'âge adulte. Les quantités de D-sérine dans ces deux zones sont croissantes pendant le développement et se stabilisent à l'âge adulte. Au contraire, dans le cervelet, les concentrations de D-sérine augmentent jusqu'au douzième jour post-natal puis diminuent ensuite jusqu'à devenir faible à l'âge adulte. Ces concentrations sont inversement corrélées à l'activité de la DAAO qui est indétectable jusqu'au douzième jour puis augmente de façon drastique et atteint son maximum à l'âge adulte (Tableau 3, Wang and Zhu, 2003).

Postnatal		Cortex	Striatum	Cerebellum
PD 1	D-serine	33.3±1.7	7±4	36±6
	DAO			
PD7	D-serine	130±8	103±3	158±6
	DAO			
PD12	D-serine			107.3±1.1
	DAO			0.10±0.02
PD18	D-serine			7.5±0.7
	DAO			1.69±0.03
PD21	D-serine	311±26	327±26	9.9±1.1
	DAO			1.95±0.05
PD49	D-serine	332±17	318±14	7.5±0.2
	DAO			2.58±0.07

Tableau 3 : Expression de la concentration de D-sérine (nmol/g de tissu frais) et de l'activité de la DAAO (mol/min/g de protéine) dans différentes structures du cerveau de souris à différents stades du développement postnatal (Wang and Zhu, 2003).

Si l'on se base sur la détection de l'activité de la DAAO par des techniques histochimiques, elle est uniquement présente dans le tronc cérébral et le cervelet (Schell et al., 1995, Loss et al., 2012). En revanche, par des techniques immunohistochimiques, elle est détectée en tant que protéine même si elle est inactive. Par ces techniques, la DAAO n'est pas uniquement détectée dans le tronc cérébral et le cervelet sur des coupes de cerveau de rats

mais elle est également présente dans de nombreuses structures du télencéphale et du diencephale comme l'hippocampe, le cortex piriforme, les ganglions de la base, le thalamus et l'hypothalamus (Moreno et al., 1999). Des marquages de DAAO humaine sur coupes de cerveau récupéré post-mortem utilisant un anticorps primaire différent de ceux utilisés par d'autres équipes indiquent la présence de la DAAO dans le cervelet, l'hippocampe, la substance noire *pars compacta* et dans le cortex préfrontal dorso-latéral et confirme les résultats obtenus chez le rat (Verrall et al., 2007).

Concernant son expression cellulaire, dans le cervelet et le tronc cérébral, pour les équipes détectant la DAAO par son activité, elle a une localisation uniquement astrocytaire (Arnold et al., 1979, Horiike et al., 1987). En revanche, par détection immunohistochimiques, Moreno et al. (1999) la détecte à la fois dans les neurones et les astrocytes tandis que Verrall et al. (2007) confirment sa localisation comme uniquement astrocytaire. L'équipe de M.P. Ceru localise la DAAO à la fois dans les neurones et dans les cellules gliales dans les diverses structures cérébrales à des concentrations différentes selon la structure (Moreno et al., 1999). En revanche, les marquages immunohistochimiques postmortem de la DAAO humaine utilisant un anticorps primaire différent indiquent un marquage uniquement neuronal dans le cortex préfrontal dorso-latéral tandis que dans l'hippocampe, la DAAO est fortement exprimée au niveau des neurones pyramidaux et plus faiblement dans la glie, tout comme dans la substance noire où elle est fortement présente dans les neurones dopaminergiques (Verrall et al., 2007).

Ces marquages montrent une localisation qui peut être à la fois astrocytaire et neuronale mais ils montrent également que la DAAO n'est pas seulement présente dans le cervelet et le tronc cérébral comme le laisse penser son activité.

Il n'y a actuellement pas d'explication pour définir cette différence de localisation entre l'expression protéique et l'activité de la DAAO observée. La présence de DAAO dans les structures du télencéphale est contradictoire avec les résultats donnant une activité de la DAAO indétectable dans cette structure. Y a-t-il réellement de la DAAO dans le télencéphale ? Si oui, y a-t-il une raison pour avoir de la DAAO présente mais inactive ? Est-ce que cette DAAO présente est réellement inactive ou juste indétectable par les méthodes utilisées ?

2.2 Dégradation par la sérine racémase

On a vu précédemment que le catabolisme de la D-sérine est réalisé principalement par la DAAO, en revanche cette enzyme a une activité indétectable dans le télencéphale. Des souris avec une DAAO inactive ont des niveaux normaux de D-sérine dans le télencéphale, cela confirme que la DAAO ne joue pas un rôle dans le métabolisme de la D-sérine dans cette région (Hashimoto et al., 1993a). Ces résultats amènent à se poser la question : comment est dégradée la D-sérine dans le télencéphale ? Le candidat le plus probable est la sérine racémase. L'équipe de H. Wolosker a mis en évidence que cette dernière peut aussi dégrader la D-sérine par α , β élimination *in vitro* (Foltyn et al., 2005). Ils ont remarqué qu'une part constante de D-sérine est éliminée par cette voie.

Ces résultats amènent plusieurs questions. Tout d'abord, comment peut-il y avoir une accumulation de D-sérine dans le cerveau si celle-ci est constamment dégradée par la sérine racémase ? Puis le point le plus important est, cette dégradation de la D-sérine par la sérine racémase est-elle confirmée *in vivo* ? Actuellement, seules des données *in vitro* sont disponibles.

3. Les mécanismes de libération et de recapture de la D-sérine

Que ce soit pour sa libération ou sa recapture, la D-sérine ne possède pas de transporteurs spécifiques connus. Cependant, les familles de transporteurs des petits amino acides neutres : Alanine-sérine-cystéine (Asc) et Alanine-Sérine-cystéine-Thréonine (ASCT), peuvent transporter la D-sérine. La famille Asc comprend plusieurs sous types, seul Asc-1 est présent dans le cerveau. Asc-1 transporte spécifiquement l'alanine, la sérine et la cystéine. Il est exprimé préférentiellement dans les neurones et est indépendant du sodium. Il possède une forte affinité pour la D-sérine avec un IC50 de 20 μ M (Fukasawa et al., 2000b, Nakauchi et al., 2000, Helboe et al., 2003). La famille ASCT comprend deux sous types présents dans le cerveau, ASCT1 et ASCT2. Cependant, ASCT1 ne transporte pas la D-sérine (Shafqat et al., 1993). ASCT2 transporte spécifiquement l'alanine, la sérine, la cystéine et la thréonine et est dépendant du sodium (Utsunomiya-Tate et al., 1996). Il a une faible affinité pour la D-sérine, contrairement à Asc-1, son IC50 est de 1 mM et il possède une haute affinité pour la L-glutamine et la L-asparagine. L'expression cellulaire de ASCT2 n'est pas aussi claire que celle de Asc-1. L'ARNm de ASCT2 a été détecté dans des cultures d'astrocytes (Broer et al., 1999, Deitmer et al., 2003) avec des évidences de son expression dans ceux-ci. Plus récemment Shao et al. (2009) ont réalisé des marquages immunohistochimiques sur des cultures d'astrocytes et de neurones. Ils ont trouvé que les neurones et les astrocytes expriment ASCT2. L'équipe d'Anderson a réalisé des marquages immunohistochimiques sur tranche de cerveau et a identifié une colocalisation de ASCT2 avec MAP-2, un marqueur des dendrites et du périkarion neuronal, impliquant également une localisation neuronale du transporteur. ASCT2 ne colocalise pas avec NeuN un marqueur nucléaire indiquant que ASCT2 n'est pas présent dans le corps cellulaire. En revanche, ASCT2 ne colocalise pas avec la GFAP ou S100 β des marqueurs spécifiques des astrocytes. Les auteurs avancent trois hypothèses pour expliquer cette différence de résultats avec la littérature et également entre les résultats trouvés *in vitro* (sur cultures de cellules) et *in vivo*. Premièrement ASCT2 n'est peut être présent que dans les astrocytes au stade embryonnaire et pendant le développement. Deuxièmement, les conditions de culture cellulaire peuvent influencer l'expression du transporteur. Il est peut être uniquement exprimé dans des astrocytes réactifs qui ne sont normalement pas exprimés dans un cerveau sain. Troisièmement, la présence d'ASCT2 est peut être limitée aux astrocytes considérés comme GFAP-négatif exprimant d'autres marqueurs comme NG2 ou aquaporine-4 (Gliddon et al., 2009). Concernant la rétine, ASCT2 a été détecté dans les astrocytes (Dun et al., 2007). Actuellement la localisation d'ASCT2 n'est toujours pas précisément connue. Contrairement à ce qui a été trouvé au départ, il serait donc soit uniquement neuronal, soit neuronal et glial.

3.1 La libération

Une fois synthétisée, la D-sérine peut être libérée dans la fente synaptique ou dans l'espace extracellulaire par deux mécanismes principaux : l'exocytose et les transporteurs.

3.1.1 Libération de la D-sérine par exocytose dépendante du calcium

Les astrocytes peuvent libérer des transmetteurs appelés gliotransmetteurs par exocytose vésiculaire calcium dépendante. Les principaux gliotransmetteurs identifiés sont le glutamate, l'ATP, l'adénosine et les cytokines (Volterra and Meldolesi, 2005). Plusieurs études sur culture d'astrocytes suggèrent que la D-sérine peut être libérée par une exocytose calcium dépendante (Mothet et al., 2005, Martineau et al., 2008). Cette libération vésiculaire par les astrocytes est confirmée sur tranches d'hippocampe par analyse des courants synaptiques, (Henneberger et al., 2010). Des données *in vivo*, sur tranches d'hippocampe de rats confirment la localisation de la D-sérine dans des vésicules observées *in vitro* par Martineau et al. (2008). La D-sérine est identifiée dans des microvésicules ressemblant aux vésicules synaptiques (SLMV) localisées dans les astrocytes périssynaptiques. Elles font 36 nm de diamètre, sont rondes, situées dans des groupes de 12 à 15 vésicules près de la membrane plasmique (Bergersen et al., 2012). Il a également été envisagé une libération vésiculaire neuronale de la D-sérine. Suite à une stimulation des neurones et en présence de bafilomycine A, un inhibiteur de V-ATPase, une libération de D-sérine a lieu, indiquant ainsi que cette libération n'est pas vésiculaire. De plus, des vésicules purifiées à partir de cortex cérébral ne contiennent pas de D-sérine dans des conditions optimales où elles se remplissent de glutamate (Kartvelishvily et al., 2006). L'équipe de H. Wolosker confirme que les neurones ne peuvent pas libérer de D-sérine par exocytose (Rosenberg et al., 2010). Ces résultats montrent une libération vésiculaire de la D-sérine uniquement astrocytaire.

3.1.2 Par les transporteurs

La libération par exocytose dépendante du calcium n'est pas le seul moyen pour la D-sérine d'être libérée. Les transporteurs de type ASC peuvent également libérer ce transmetteur. Des expériences sur cultures d'astrocytes montrent que de la D-sérine est libérée en réponse à l'incubation de petits acides aminés comme la L-sérine, L-thréonine ou L-alanine suggérant l'existence d'un hétéro-échange réalisé par les transporteurs ASC (Ribeiro et al., 2002). Récemment, Rosenberg et al. (2010) et (2013) ont mis en évidence sur cultures de neurones, sur tranches corticales et *in vivo* que la D-sérine n'est pas libérée par exocytose vésiculaire synaptique dans les neurones mais par le transporteur Asc-1.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer une libération exocytotique de la D-sérine pour les astrocytes et une libération par le transporteur Asc-1 pour les neurones. On peut également supposer aux vues des données une libération par les astrocytes liée à l'activité neuronale permise par la rapidité de la mobilisation vésiculaire et une libération par les transporteurs liée au maintien de la concentration basale de D-sérine. Ces hypothèses restent

encore à confirmer. On peut également s'interroger sur un rôle potentiel d'ASCT2 dans la libération de la D-sérine.

3.2 La recapture

La D-sérine présente dans l'espace extracellulaire peut être éliminée par les cellules environnantes. Le principal mécanisme envisagé pour cette élimination est la recapture. Ribeiro et al. (2002) ont montré que la D-sérine peut être éliminée de l'espace extracellulaire par des cultures d'astrocytes. La D-sérine ne possédant pas de transporteurs spécifiques, les transporteurs des petits acides aminés sont envisagés pour sa recapture. Les deux candidats les plus probables sont Asc-1 et ASCT2. Dans les conditions d'expérimentation de H. Wolosker, lorsque le sodium est remplacé par de la glycine, ils observent une forte diminution de la recapture. Cela indique qu'ASCT2 semble impliqué pour la recapture de la D-sérine contrairement à Asc-1. Des souris KO pour Asc-1 présentent un déficit de la recapture de la D-sérine, celle-ci n'est pas inexistante mais fortement diminuée. Pour les auteurs de ces travaux, Asc-1 est responsable de 70% de la recapture et un deuxième système de recapture est impliqué et semble posséder une faible affinité pour la D-sérine (Rutter et al., 2007). On peut supposer que ce transporteur à faible affinité est ASCT2.

Concernant la recapture de la D-sérine, l'implication des transporteurs Asc-1 et ASCT2 a été montrée *in vitro*. Ces résultats restent à confirmer *in vivo*.

4. Hypothèse d'une navette de D-sérine entre les neurones et les astrocytes

L'équipe de H. Wolosker propose l'hypothèse d'une navette pour la D-sérine et la L-sérine entre les neurones et les astrocytes. La L-sérine est produite à partir du glucose dans les astrocytes puis libérée dans l'espace extracellulaire par le transporteur ASCT2. Elle est ensuite recaptée par les neurones par l'intermédiaire du transporteur Asc-1. Celle-ci va permettre la synthèse de la D-sérine par la sérine racémase au niveau neuronal. La sérine racémase peut également dégrader la L-sérine et la D-sérine en pyruvate + NH₃ par α , β élimination. La D-sérine produite va être libérée dans l'espace extracellulaire par l'hétéro-échangeur Asc-1. Elle peut ensuite être recaptée par les astrocytes par l'intermédiaire d'ASCT2. Les astrocytes peuvent eux aussi libérer de la D-sérine par une exocytose dépendante du calcium. Dans ce concept, l'activation des récepteurs NMDA peut être faite par de la D-sérine provenant à la fois des neurones et des astrocytes (Wolosker, 2011, Figure 4).

Le schéma proposé par H. Wolosker repose sur des données obtenues *in vitro* ou sur tranches. Il serait maintenant intéressant de savoir ce qu'il en est *in vivo*, Asc-1 et ASCT2 peuvent-ils libérer et/ou recapter la D-sérine ? Est-ce que la sérine racémase peut également dégrader la D-sérine *in vivo* ?

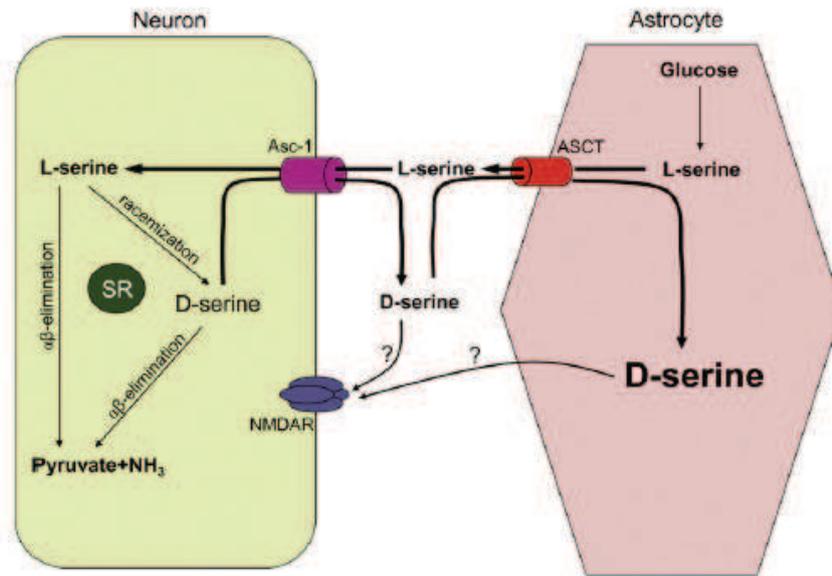


Figure 4 : La navette de la D-sérine et de la L-sérine entre les neurones et les astrocytes (Wolosker, 2011).

B. Les récepteurs de la D-sérine

Actuellement, la D-sérine possède deux récepteurs connus, les récepteurs NMDA et Glu δ 2. Jusqu'à récemment, le récepteur NMDA était identifié comme le seul récepteur de la D-sérine. Découvert en 1993, le récepteur glu δ 2 a été identifié comme récepteur de la D-sérine en 2007 (Naur et al., 2007).

1. Le récepteur NMDA

1.1 Description

Le récepteur NMDA est un récepteur ionotropique au glutamate, tétramérique, composé de l'association de quatre sous unités. Dans le SNC des mammifères, un récepteur fonctionnel est généralement composé de deux sous unités NR1 et deux sous unités NR2. La sous unité NR1 possède huit isoformes distincts résultant de trois sites indépendants d'épissage alternatif. Il existe quatre sous unités NR2 (NR2A à D). Une sous unité NR est schématiquement composée de quatre domaines fonctionnels. Le premier est un domaine N-terminal extracellulaire. Le second est le domaine de liaison à l'agoniste. Le troisième est formé de domaines transmembranaires constituant le canal du récepteur (M1 à M4). Le quatrième et dernier est le domaine C-terminal. Le récepteur NMDA est perméable aux cations divalents comme le calcium et le zinc ainsi qu'au cation monovalent comme le sodium. Lorsque le récepteur est inactif, son canal est bloqué par un ion magnésium. Pour l'activation du récepteur, plusieurs conditions sont requises. La membrane plasmique doit être

dépolarisée pour permettre le déplacement de l'ion magnésium qui bloque le canal, et le glutamate et un de ses co-agoniste (la D-sérine ou la glycine) doivent être liés au récepteur. Le glutamate, l'agoniste principal du récepteur NMDA se fixe sur la sous unité NR2 tandis que les co-agonistes, D-sérine ou glycine, se fixent sur la sous unité NR1 (Martineau et al., 2006, Groc et al., 2009). Chaque sous unité possède un site pouvant influencer sa régulation. La sous unité NR2 contient un site d'inhibition occupé par l'ifenprodil ou par l'ion Zinc et la sous unité NR1 comprend un site de liaison pour les protons pouvant influencer son état d'oxydo-réduction (Figure 5, Martineau et al., 2006).

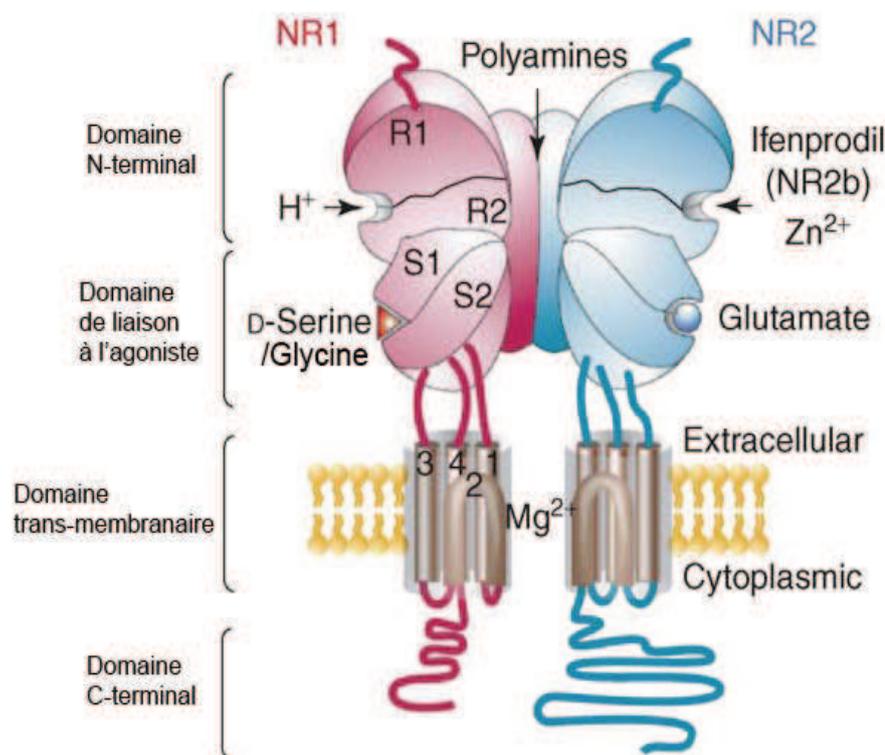


Figure 5 : Représentation schématique du récepteur NMDA.

Le récepteur NMDA est composé d'un domaine N-terminal, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine de liaison à l'agoniste : glutamate pour la sous unité NR2, D-sérine ou glycine pour la sous unité NR1, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal. Le domaine N-terminal comporte deux structures R1 et R2 contenant des sites de régulation du récepteur. La sous unité NR2 contient un site d'inhibition pour la fixation de l'ifenprodil ou de l'ion Zinc. La sous unité NR1 comprend un site de liaison pour les protons pouvant influencer son état d'oxydo-réduction (Martineau et al., 2006).

1.2 Expression des sous-unités

Le récepteur NMDA composé de deux sous unités NR1 et de deux sous unités NR2A ou NR2B est majoritaire dans le SNC des mammifères. Cela peut s'expliquer par l'expression

majoritaire de ces sous unités. La sous unité NR1, la première clonée par Moriyoshi et al. (1991) est ubiquitaire. L'expression des sous unités NR2 n'est pas la même pendant le développement et à l'âge adulte. Le récepteur NMDA majoritaire composé des sous unités NR1 et NR2 va évoluer d'une composition tétramérique prédominante en sous unité NR2B pendant le développement à une composition contenant soit NR2A/NR2A, soit NR2B/NR2B, ou NR2A/NR2B à l'âge adulte (Groc et al., 2006). Pendant le stade embryonnaire, la sous unité NR2B est fortement exprimée dans la plupart des régions du cerveau tout comme la sous unité NR2D qui pour sa part est présente uniquement dans le diencephale et le tronc cérébral. Les sous unités NR2A et NR2C apparaissent après la naissance. La sous unité NR2A est exprimée ubiquitairement tandis que la sous unité NR2C est prédominante dans le cervelet. A l'âge adulte, des sous unités NR2A et NR2C vont venir s'ajouter aux sous unités NR2B et NR2D préexistantes et dans certains cas les remplacer comme par exemple dans le cervelet où la sous unité NR2C va remplacer la sous unité NR2B (Monyer et al., 1994, Cull-Candy et al., 2001).

1.3 Localisation

Le récepteur NMDA peut être classifié en trois catégories dépendantes en fonction de sa position à la surface de la membrane plasmique : a) synaptique b) pérисynaptique c) extrasynaptique. Les récepteurs synaptiques répondent au glutamate libéré par les vésicules présynaptiques. Les récepteurs pérисynaptiques sont également activés par le glutamate synaptique mais seulement lors d'une forte concentration de glutamate dans la fente synaptique. Lors de conditions physiologiques, les récepteurs extrasynaptiques ne sont pas activés par le glutamate synaptique mais par du glutamate provenant d'autres sources. Récemment, il a été montré que les récepteurs ne sont pas immobiles mais diffusent entre la région synaptique et extrasynaptique (Tovar and Westbrook, 2002, Groc and Choquet, 2006). La région pérисynaptique peut contenir des récepteurs mobiles qui sont en transit à partir de la région postsynaptique ou extrasynaptique. En fonction de l'activité synaptique, lorsque celle-ci est plus faible, les récepteurs sont sous régulés et l'ancrage au cytosquelette d'actine diminue, facilitant ainsi leur mobilité. Les récepteurs selon un processus de diffusion latérale passent de la région synaptique à extrasynaptique. Au niveau extrasynaptique se situe une zone d'endocytose où les récepteurs peuvent être dégradés ou recyclés. Lorsqu'ils sont recyclés et que l'activité synaptique augmente, les récepteurs vont être exocytés au niveau de la membrane extrasynaptique et vont pouvoir repartir par diffusion latérale jusqu'à la région pérисynaptique puis synaptique (Figure 6).

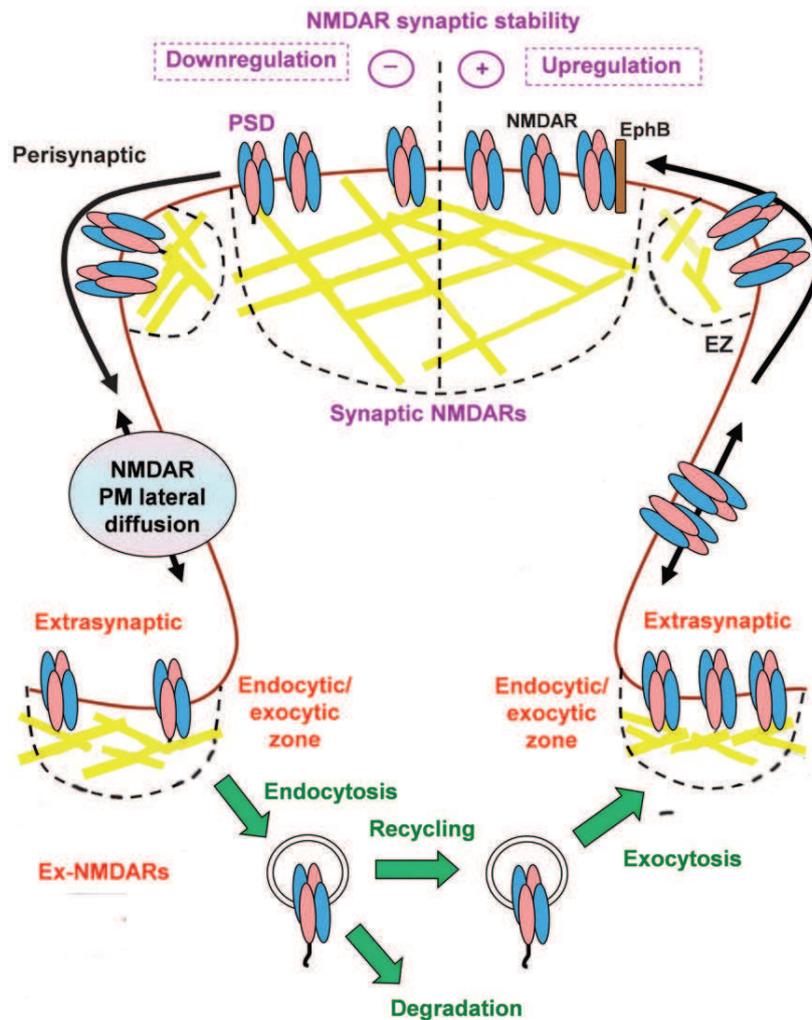


Figure 6 : Modulation de la localisation des récepteurs NMDA à la membrane plasmique. Les récepteurs synaptiques sont ancrés par le cytosquelette d'actine (en jaune) à la densité post-synaptique. Lors d'une plus faible activité synaptique, ils diffusent en périssynaptique puis en extrasynaptique par diffusion latérale. Lorsqu'ils sont présents à la membrane périssynaptique ou extrasynaptique, ils sont ancrés au cytosquelette d'actine. Une fois présents en extrasynaptique, les récepteurs peuvent être endocytés pour être soit dégradés soit recyclés. Lorsqu'ils sont recyclés, ils sont exocytés en extrasynaptique par exemple en réponse à une plus forte activité synaptique et par diffusion latérale ils vont de nouveau en périssynaptique et à la densité post-synaptique. (Gladding and Raymond, 2011).

La position du récepteur à la surface de la membrane plasmique est influencée par le sous type de la sous unité NR2. Avant la formation des synapses, pendant le développement, les récepteurs NMDA sont composés des sous unités NR1/NR2B. Une fois le développement synaptique terminé, la majorité des récepteurs NMDA fortement sensibles à l'ifenprodil, un antagoniste spécifique de la sous unité NR2B, sont situés en extrasynaptique. Les récepteurs NMDA synaptiques deviennent insensibles à l'ifenprodil à l'âge adulte indiquant une incorporation de la sous unité NR2A une fois les synapses devenues fonctionnelles (Tovar and Westbrook, 1999). L'inhibition de la sous unité NR2A empêche l'induction de la LTP contrairement à l'inhibition de la sous unité NR2B (Liu et al., 2004). Ce résultat est confirmé

chez des souris KO pour la sous unité NR2A présentant des déficits pour l'induction de la LTP (Townsend et al., 2003). L'application de Ro25-6981, un antagoniste de la sous unité NR2B, sur des tranches d'hippocampe de rats n'affecte pas les potentiels excitateurs post-synaptiques. En revanche l'application de zinc libre, un inhibiteur allostérique spécifique de la sous unité NR2A agissant comme un antagoniste partiel, réduit fortement les courants excitateurs post-synaptiques de la synapse (Papouin et al., 2012). Ces études confirment la localisation synaptique de la sous unité NR2A et extrasynaptique de la sous unité NR2B.

1.4 D-sérine ou glycine, y a-t-il un co-agoniste prédominant ?

Pour être activé, le récepteur NMDA nécessite une dépolarisation de la membrane, la fixation de son agoniste principal le glutamate ainsi que la fixation d'un co-agoniste, la D-sérine ou la glycine. Le site de fixation est communément appelé le « site glycine » car la glycine a été suggérée en premier comme le co-agoniste endogène du récepteur par Marksteiner et al. (1990). Schell et al. (1997) ont montré à l'aide de marquages immunohistochimiques que la D-sérine possède une distribution semblable à celle du récepteur NMDA, plus particulièrement à celle du sous type NR2A/B. La D-sérine et le récepteur NMDA sont fortement présents dans la matière grise et le télencéphale comme par exemple dans le cortex, l'hippocampe, le cortex piriforme ou l'amygdale. En revanche, le marquage de la glycine apparaît dans des zones pauvres en récepteurs NMDA comme l'hypothalamus ou le rhombencéphale. Le bulbe olfactif contient à la fois de la D-sérine, de la glycine et des récepteurs NR2A/B. Ces résultats ont permis de considérer la D-sérine comme un co-agoniste endogène des récepteurs NMDA au même titre que la glycine (Figure 7).

Des études par microdialyse ont également apporté des preuves indirectes indiquant que la D-sérine peut être considérée comme un co-agoniste endogène des récepteurs NMDA. Celles-ci ont montré que la concentration extracellulaire de D-sérine est comparable à celle de la glycine dans plusieurs aires cérébrales (Hashimoto et al., 1995a) tandis que l'affinité des récepteurs NMDA pour la D-sérine est plus élevée que celle pour la glycine chez la souris (Matsui et al., 1995). Lorsqu'on regarde l'affinité de la D-sérine par rapport à celle de la glycine pour le récepteur NMDA humain, les résultats sont plus contrastés. La D-sérine a plus d'affinité pour le récepteur NMDA contenant une sous unité NR2A (EC₅₀ de 0.22 pour la D-sérine contre 0.53 μ M pour la glycine) tandis que la glycine a plus d'affinité pour la sous unité NR2B (EC₅₀ de 0.057 pour la glycine contre 0.15 μ M pour la D-sérine, Priestley et al., 1995). Une étude sur tranches d'hippocampe indique que la D-sérine plutôt que la glycine est le principal agoniste du récepteur NMDA dans les aires cérébrales impliquées dans des processus mnésiques et particulièrement dans l'hippocampe (Mothet et al., 2000a). Plus récemment, Papouin et al. (2012) ont mis en évidence que les récepteurs NMDA synaptiques et extrasynaptiques ne sont pas activés par le même co-agoniste endogène. Leur travaux, sur tranche d'hippocampe de rat, montrent que la D-sérine est le co-agoniste endogène des récepteurs synaptiques tandis que la glycine est le co-agoniste endogène des récepteurs extrasynaptiques. Ils montrent également que les récepteurs synaptiques sont composés en

majorité de sous unité NR2A, confirmant ainsi les résultats de Priestley et al. (1995) obtenus pour des récepteurs humains sur culture de cellules.

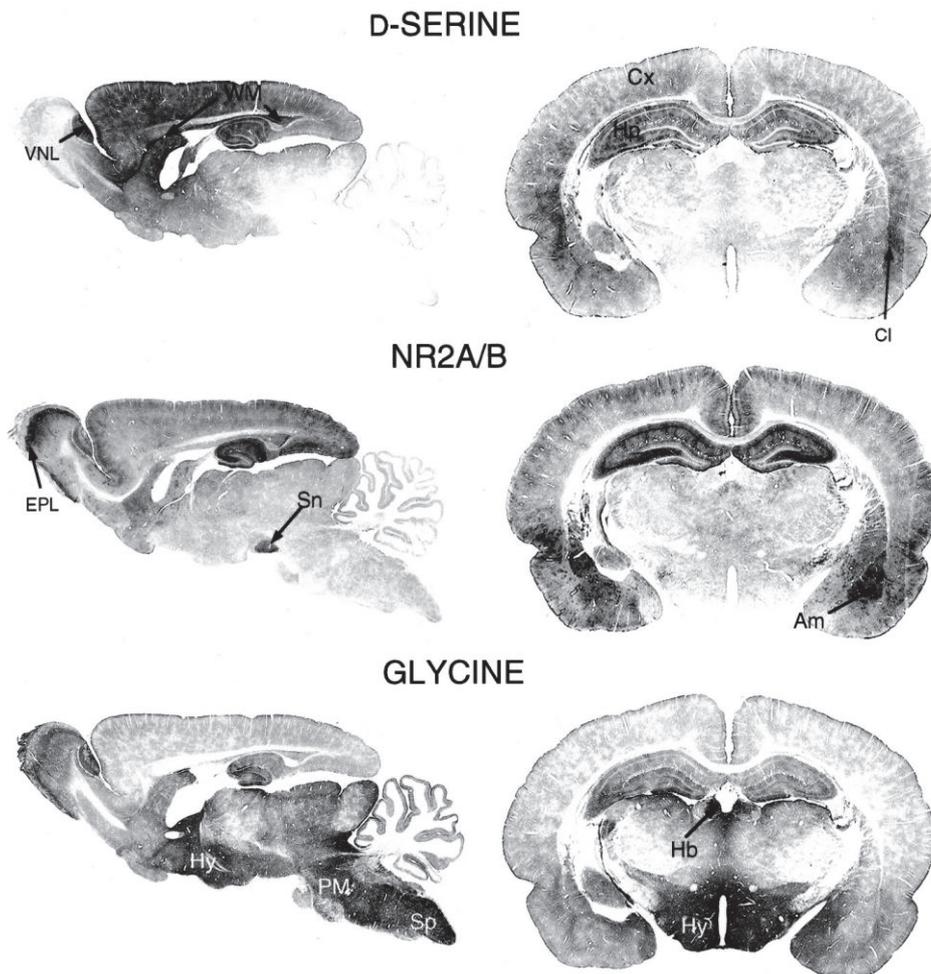


Figure 7 : Coupe de cerveau de rats à P21 avec un marquage spécifique de la D-sérine, du récepteur NR2A/B et de la glycine. *Am*: Amygdale; *Cl*: claustrum; *Cx*: cortex; *EPL*: couche du plexiforme externe; *Hb*: habenula; *Hp*: hippocampe; *Hy*: hypothalamus; *PM*: pons/medulla; *Sn*: substance noire; *Sp*: moëlle épinière; *WM*: substance blanche; *VNL*: couche du nerf vomeronasal. (Schell et al., 1997).

Concernant l'occupation du site glycine/D-sérine en extrasynaptique, des contradictions sont fortement présentes. Les EC_{50} obtenus *in vitro* concernant l'affinité de la sous unité NR2B et donc le compartiment extrasynaptique sont surprenants (0.057 pour la glycine contre 0.15 μM pour la D-sérine). Les concentrations de D-sérine obtenues *in vivo* par microdialyse sont de 5,75 μM dans le cortex préfrontal, 7,25 μM dans le striatum et 0,5 μM dans le cervelet pour Hashimoto et al. (1995a). Quelques années plus tard la concentration de D-sérine est évaluée à 8 μM dans le cortex et 5.8 μM dans le striatum (Ciriacks and Bowser, 2004, Collombet et al., 2006b). Dans notre laboratoire, la concentration de D-sérine extracellulaire, mesurée à l'aide de biocapteurs enzymatiques, est estimée à 2,3 μM dans le cortex frontal et 2,8 μM dans l'hippocampe (Pernot et al., 2012). Si l'on se réfère aux EC_{50} ,

toutes ces concentrations obtenues *in vivo* sont considérées comme saturantes. Pourtant les niveaux extracellulaires de D-sérine peuvent être augmentés par administration périphérique de D-sérine (Pernot et al., 2012) et cela peut provoquer l'amélioration de taches mnésiques (Zhang et al., 2008, Matsuda et al., 2010). Après ajout de BsGO qui dégrade spécifiquement la glycine, sur des tranches d'hippocampe, le courant tonique des récepteurs NMDA extrasynaptiques est diminué de 54,8% (Papouin et al., 2012). En tenant compte des mesures de D-sérine *in vivo*, on aurait donc un site doublement saturé en extrasynaptique et le récepteur devrait tout de même être saturé après dégradation de la glycine.

Qui de la D-sérine ou de la glycine est nécessaire à l'activation des récepteurs NMDA, ce n'est pas si évident à déterminer que l'a montré Schell et al. (1997). Ce n'est pas parce que la D-sérine au niveau immunohistochimique est colocalisée avec les récepteurs NMDA NR2A/B contrairement à la glycine qu'elle est le co-agoniste prédominant du récepteur. Il apparaît que les deux co-agonistes sont nécessaires de façon dépendante du type de sous unité du récepteur.

2. Le récepteur Glu δ 2

Le récepteur δ 2 au glutamate (Glu δ 2) fait partie de la famille des récepteurs ionotropiques. Il a été isolé et cloné chez la souris et le rat par Lomeli et al. (1993) et Araki et al. (1993) respectivement. Le récepteur Glu δ 2 est principalement exprimé dans les cellules de Purkinje du cervelet. Takayama et al. (1995) ont montré par microscopie électronique que ce récepteur se localise plus précisément dans les épines dendritiques des cellules de Purkinje. Des souris mutantes pour Glu δ 2 présentent à la fois une dépression à long terme (LTD) déficitaire, une altération de la formation des synapses et un déficit dans la coordination motrice (Kashiwabuchi et al., 1995). Le récepteur Glu δ 2 a longtemps été classifié comme récepteur orphelin car aucun des agonistes des récepteurs ionotropiques au glutamate testés n'induit d'activité ionique. Plus récemment, Naur et al. (2007) ont montré par cristallographie que le domaine de liaison au ligand se ferme lorsqu'il a lié la D-sérine et que des changements conformationnels interviennent modifiant la perméabilité aux ions. Kakegawa et al. (2011) se sont demandés si la non production de courant suite à la fixation de la D-sérine sur le récepteur n'était pas due au fait que les études ont été réalisées uniquement *in vitro* sur culture de cellules. Pour cela, ils ont réalisé leur étude *in vivo*, sur tranche de cervelet. Ils ont montré qu'un ajout de D-sérine exogène sur les tranches de cervelet immature induit une diminution de l'amplitude des EPSC au niveau des fibres parallèles en modulant le trafic des récepteurs AMPA post-synaptique par leur endocytose. L'activation des récepteurs Glu δ 2 par la D-sérine exogène permet une induction de la LTD. Ils ont également montré que de la LTD est induite dans les tranches de cervelet immatures par libération de D-sérine endogène par la glie de Bergmann lors de l'augmentation de l'activité neuronale. Ces résultats ont lieu uniquement sur tranches de cervelet immature. Tous ces résultats démontrent que la D-sérine par fixation sur le récepteur Glu δ 2 induit de la LTD et régule les fonctions du cervelet durant le développement précoce. Cette activation par la D-sérine est sûrement liée aux fortes concentrations transitoires de D-sérine dans le cervelet, permettant ainsi l'acquisition d'une coordination motrice et d'un apprentissage plus efficace pendant les périodes de

développement précoce. Le récepteur Glu δ 2 possède un EC50 de 187 μ M pour la D-sérine (Naur et al., 2007). De fortes concentrations de D-sérine sont donc nécessaires pour l'activer, environ 300 fois plus élevées que celles détectées *in vivo* chez le rat adulte (Hashimoto et al., 1995a, Pernot et al., 2012).

C. Implications physiologiques de la D-sérine

La D-sérine est impliquée dans plusieurs processus physiologiques. Elle est tout d'abord indispensable au développement du système nerveux central mais également nécessaire pour la transmission synaptique et les processus mnésiques.

1. Implication de la D-sérine dans le développement du système nerveux central

La première indication d'un rôle de la D-sérine dans le développement du SNC a été la découverte de concentrations élevées de D-sérine chez le rat et l'homme pendant le développement embryonnaire et la période de développement postnatal (Hashimoto et al., 1995a, Schell et al., 1997). Un pic de D-sérine est également observé dans du liquide céphalo rachidien humain pendant la période postnatale précoce (Horiike et al., 1987). Cette forte concentration de D-sérine coïncide avec une augmentation de l'activité des récepteurs NMDA (Verrall et al., 2007). Elle coïncide également avec une forte expression de la sérine racémase qui est exprimée dans le cervelet après la naissance pour ensuite disparaître complètement à l'âge adulte (Wang and Zhu, 2003). Toutes ces observations impliquent la D-sérine dans le développement du système nerveux central et principalement dans celui du cervelet.

1.1 Implication dans la migration neuronale et la synaptogénèse

La D-sérine a donc une implication dans le développement du cervelet et plus particulièrement dans la synaptogénèse et la migration neuronale.

Chez le rat, chaque cellule de Purkinje est innervée par plusieurs fibres grimpantes durant la première semaine après la naissance. Puis une élimination massive de la plupart des synapses a lieu. Entre 14 et 15 jours après la naissance, une seule fibre innerve chaque cellule de Purkinje. Ce processus fait partie du développement physiologique et assure une bonne connectivité entre les cellules. En 1992, Rabacchi et al. (1992) ont montré par des applications chroniques *in vivo* d'antagonistes des récepteurs NMDA que leur activation est une étape critique pour l'élimination des synapses pendant le développement du cervelet de rats. La migration des neurones immatures depuis leur lieu de naissance jusqu'à leur localisation finale est essentielle pour la formation de neurones normaux et de réseaux neuronaux fonctionnels. L'importance de la D-sérine a été mise en évidence dans la formation et l'élimination des synapses, dans la migration neuronale du cervelet en développement chez le rat (Schell et al., 1997). Des tranches de cervelet à P10 traitées avec de la DAAO ont leur transmission glutamatergique et la concentration de D-sérine diminuées. Il en résulte une

diminution de la migration des cellules granulaires d'environ 60%. Le traitement des mêmes tranches avec de la D-sérine restaure la migration. Les auteurs de ces travaux proposent un modèle pour expliquer la régulation de la migration des cellules granulaires du cervelet. Le glutamate active les récepteurs AMPA sur la glie de Bergmann induisant ainsi la phosphorylation et la dissociation du récepteur de la protéine GRIP. GRIP va ensuite se lier à la sérine racémase et l'activer. Cela entraîne la synthèse de D-sérine qui va se joindre au glutamate pour activer le récepteur NMDA sur les cellules granulaires, libérant ainsi du calcium intracellulaire qui va faciliter la migration des cellules de la couche granulaire externe à la couche granulaire interne (Figure 8, Kim et al., 2005).

Le rôle de la D-sérine dans le développement est principalement connu dans le cervelet. Une étude par spectrométrie de masse confirme la présence de la sérine racémase dans le noyau périréticulaire humain, une structure transitoire présente pendant le développement (Hepner et al., 2005). Le noyau périréticulaire est impliqué dans le guidage des fibres corticofugales et thalamocorticales lors du développement du système nerveux central (Ulfig et al., 2000). Ces résultats indiquent que la D-sérine peut également jouer un rôle dans le guidage des fibres et intervenir dans le développement d'autres structures que le cervelet.

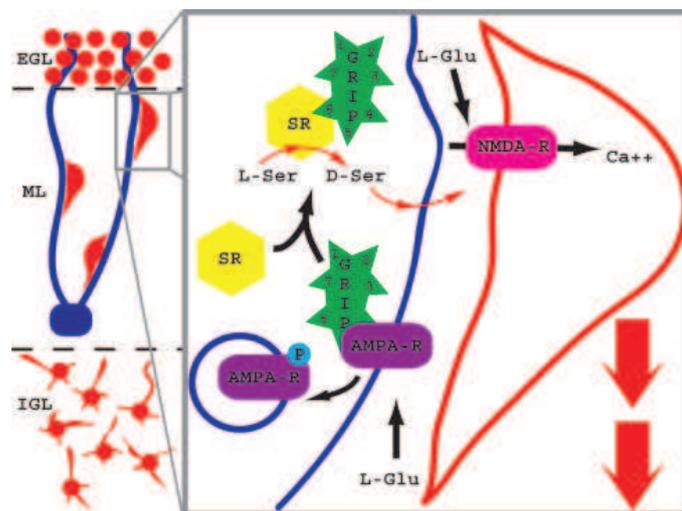


Figure 8 : Modèle de la régulation la migration des cellules granulaires du cervelet par la D-sérine et le glutamate (Kim et al., 2005).

EGL: couche granulaire externe. *IGL*: couche granulaire interne. *ML*: couche intermédiaire *SR*: sérine racémase.

2. Implication dans la transmission synaptique, dans l'apprentissage et la mémorisation

La plasticité synaptique est la capacité qu'a la synapse de modifier sa réponse à un même stimulus au cours du temps. La potentialisation à long terme (LTP) est le renforcement de la

transmission du signal entre deux neurones activés simultanément. La LTP a été découverte en 1973 et est considérée comme l'un des principaux mécanismes cellulaires permettant l'apprentissage et la mémoire chez les vertébrés. Elle a été mise en évidence dans toutes les voies excitatrices de l'hippocampe mais également dans plusieurs autres régions du cerveau permettant la mémorisation (Bliss and Collingridge, 1993). Les propriétés de la LTP ont été prédites par le neurophysiologiste Donald Hebb (1949) bien avant sa découverte. Ces propriétés nécessaires à son induction sont l'associativité, la coopérativité et la spécificité. La LTP est persistante, d'une durée de plusieurs minutes à plusieurs mois et elle est dépendante des récepteurs NMDA. Au potentiel de repos, les récepteurs sont inactifs car le canal ionique est bloqué par un ion magnésium même en présence de glutamate. Une dépolarisation de la membrane est nécessaire en plus de la fixation du glutamate sur les récepteurs postsynaptiques pour expulser l'ion magnésium et ainsi activer les récepteurs NMDA. L'influx de calcium généré active des protéines kinases comme la calmoduline kinase II (CaMKII) ou des phosphatases générant une série de cascades biochimiques dans le neurone postsynaptique (Zhuo, 2009).

La D-sérine est nécessaire à l'activation des récepteurs NMDA, il semble donc naturel de lui envisager un rôle dans la transmission et la plasticité synaptique. Lorsque le niveau de D-sérine endogène est réduit suite à l'application de DAAO sur des neurones d'hippocampe en culture, la transmission synaptique dépendante des récepteurs NMDA est réduite tandis que l'application de D-sérine restaure cette transmission (Mothet et al., 2000a). Un autre rôle dans la potentialisation à long terme a également été établi par Yang et al. (2003). Les auteurs ont montré que la D-sérine endogène est cruciale pour l'induction de la LTP sur des cultures de neurones et sur tranches d'hippocampe. Similairement, une étude sur cellules pyramidales de l'hippocampe démontre que l'induction de la LTP NMDA-dépendante dépend de la libération exocytotique de la D-sérine par un astrocyte proche de la synapse excitatrice stimulée. Une activité synaptique répétitive et transitoire augmente sa libération par la glie ainsi que le calcium présent dans les astrocytes. Ce travail montre que premièrement, la D-sérine est nécessaire à la LTP et que deuxièmement, elle est libérée par exocytose par les astrocytes (Henneberger et al., 2010). Des travaux sur souris KO confirment ces résultats. Chez ces souris où la concentration de D-sérine est réduite de 90%, un affaiblissement de la transmission NMDA et une diminution de la LTP sont observés (Basu et al., 2009). Des KO conditionnels pour la sérine racémase neuronale ont également une suppression de la LTP NMDA dépendante (Benneyworth et al., 2012). En revanche, des souris KO pour la D-amino acide oxydase ont leur concentration en D-sérine augmentée et une facilitation de la LTP au niveau de CA1 est observée (Maekawa et al., 2005).

La D-sérine est également impliquée dans la dépression à long terme ou LTD. Zhang et al. (2008) ont montré que la D-sérine exogène régule la LTD dans la région CA1 de l'hippocampe. Les auteurs montrent également que sa libération endogène par les astrocytes est nécessaire à l'induction de la LTD. La quantité de D-sérine libérée pendant la LTD est dépendante de l'intensité de stimulation. Ainsi, sa libération est directement reliée à l'activité neuronale.

Le rôle de la D-sérine dans la LTP et la LTD l'implique donc dans les fonctions d'apprentissage et de mémorisation. Une étude récente de Vargas-Lopes et al. (2011) montre que des modifications de la phosphorylation de la sérine racémase par la PKC module le

niveau de D-sérine présent et ainsi influence la mémorisation. La mémoire spatiale est une des plus étudiées parmi les différents types de mémoire car elle est localisée dans l'hippocampe, zone privilégiée pour la mise en place de la LTP et LTD. Des expériences comportementales montrent que la D-sérine joue un rôle crucial dans la mémoire spatiale (Zhang et al., 2008). Les tests comportementaux montrent également que l'apprentissage spatial est meilleur chez les souris KO pour la DAAO comparé aux contrôles. En revanche, les souris KO pour la sérine racémase ont un déficit de la mémoire spatiale (Maekawa et al., 2005, Basu et al., 2009). Ces souris ont également leur mémoire de reconnaissance d'objet perturbée (DeVito et al., 2011). La D-sérine est également impliquée dans un troisième type de mémorisation, la reconnaissance d'un nouvel objet par exemple. Des souris recevant une injection quotidienne de D-sérine augmentent leur reconnaissance des objets à long terme ainsi que leur performance dans le labyrinthe en T (Bado et al., 2011).

La D-sérine est également impliquée dans un autre type de mémorisation : la mémoire d'extinction de la peur. Cela consiste à l'extinction des réponses apprises dans un contexte de peur. Matsuda et al. (2010) ont montré que la D-sérine peut augmenter l'extinction de la peur par phosphorylation de ERK dans l'hippocampe et dans l'amygdale basolatérale en consolidant et/ou en conservant la mémoire d'extinction de la peur. Des souris KO pour la DAAO présentant une augmentation des niveaux de D-sérine dans le cerveau, montrent une augmentation de l'inversion de la mémoire et une extinction de l'apprentissage dans le labyrinthe de Morris ainsi qu'une extinction de la peur conditionnée au contexte. L'administration de D-cyclosérine, un agoniste partiel des récepteurs NMDA se liant au site glycine/D-sérine, facilite l'extinction de la peur chez le rat (Collombet et al., 2006a) et chez des patients en complément de psychothérapies (Liang et al., 2007).

Ces résultats confirment ainsi l'importance de la D-sérine dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Ces différents types de mémoire sont altérés dans de nombreuses pathologies. L'implication de la D-sérine dans les processus d'extinction ouvre de nouvelles pistes de traitement pour les troubles anxieux par exemple.

3. Implication dans l'apoptose

L'apoptose est un processus pouvant être à la fois physiologique pendant le développement, on parle alors de mort cellulaire programmée mais également pathologique comme par exemple lorsqu'elle est excessive dans les maladies neurodégénératives. Concernant l'apoptose physiologique, elle joue un rôle important pendant la première semaine du développement du cervelet. Au cours de leur migration postnatale, les neurones granulaires du cervelet nécessitent des stimulations glutamatergiques excitatrices pour se différencier de façon appropriée. Si ils ne reçoivent pas ces stimulations, ils meurent par apoptose (Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988). La sérine racémase a été identifiée récemment comme un acteur crucial de l'apoptose des neurones granulaires du cervelet. Elle intervient lors de deux étapes de l'apoptose. Premièrement, durant la phase précoce de l'apoptose, la sérine racémase est sous régulée par l'intermédiaire de système ubiquitine protéasome et JNKs et il en résulte une diminution de la concentration de D-sérine. L'administration de D-sérine ou la surexpression de la sérine racémase inhibe l'apoptose tandis que la suppression de son activité exacerbe

l'apoptose. Les auteurs relient cette protection, due à une forte concentration de D-sérine, à celle existante pour les récepteurs NMDA médiée par l'inhibition de l'activation des caspases 3 (Hardingham and Bading, 2010). Deuxièmement, elle intervient durant la phase tardive de l'apoptose pendant laquelle le niveau de sérine racémase augmente et contribue à la mort des derniers neurones restants. L'hypothèse avancée est que l'augmentation de la sérine racémase est le dernier effort réalisé par les neurones pour empêcher l'apoptose bien que celle-ci soit enclenchée (Esposito et al., 2012).

Ces résultats montrent que la sérine racémase et la D-sérine sont impliquées dans un processus d'apoptose physiologique. Une dérégulation du métabolisme de la sérine racémase et/ou de la D-sérine peut être envisagée dans des pathologies neurodégénératives où il y a une exacerbation de l'apoptose.

4. Implication dans le vieillissement

Le vieillissement physiologique du cerveau est généralement accompagné de déficits cognitifs en particulier de la mémoire et de l'apprentissage (Driscoll et al., 2003, Rosenzweig and Barnes, 2003). Le vieillissement normal n'est pas accompagné d'une perte significative de neurones. Une des premières études réalisées ne trouve pas de différence de concentration significative de la D-sérine chez des rats âgés de 86 semaines (Hashimoto et al., 1993b). Un modèle génétique de sénescence accélérée est utilisé pour étudier les modifications dues à l'âge. Ces souris appelées SAMP8 (Senescence Accelerated Mice Prone8) présentent un raccourcissement de leur durée de vie et montrent des manifestations précoces de signes de sénescences comme une détérioration de l'apprentissage et de la mémoire. Une première étude suggère que les sites de liaison de la D-sérine sont diminués chez ces souris tandis que la concentration de D-sérine n'est pas modifiée (Nagata et al., 1998). Quelques années plus tard, une autre étude montre que ces souris possèdent un déficit dans l'induction de la LTP. Contrairement à l'étude précédente, les auteurs émettent l'hypothèse que ce déficit est dû à une diminution des niveaux de D-sérine (Yang et al., 2005). L'équipe de J.M. Billard, à l'aide de mesures effectuées par HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) révèle que le niveau de D-sérine dans l'hippocampe est drastiquement diminué chez des rats âgés comparés à de jeunes rats ($3,4 \pm 1$ nmol/mg contre 16 ± 3.1 nmol/mg de protéine respectivement) tandis que le niveau de L-sérine est légèrement augmenté. Ainsi le ratio D/L sérine est fortement diminué chez les rats âgés, 0.06 contre 0.42 chez les jeunes rats. Des analyses par RT-PCR et western blot semi quantitatif montrent une forte diminution de l'ARNm et de l'expression protéique de la sérine racémase dans l'hippocampe des rats âgés. Bien que l'ARNm de la DAAO soit légèrement diminué, aucune modification de l'expression protéique n'est observée. Des altérations dans le métabolisme de la D-sérine sont donc observées chez le rat âgé et reliées à une diminution des capacités de mémorisations et de potentialisation à long terme (Mothet et al., 2006). Junjaud et al. (2006) mesurent également une diminution des niveaux de D-sérine dans le tissu hippocampal chez des rats âgés.

La diminution d'ARNm et protéique de la sérine racémase et par conséquent de la concentration de D-sérine est observée uniquement dans l'hippocampe tandis que le cortex et le cervelet ne sont pas touchés bien qu'une diminution des fonctions cognitives du cortex

préfrontal comme la mémoire de travail a également lieu pendant le vieillissement. Cela suggère une altération de cibles différentes et spécifiques selon la zone du cerveau lors du vieillissement. Cette forte diminution de la quantité de D-sérine trouvée par l'équipe de J.M. Billard contredit les premières études qui ne mesuraient pas de modification. Le fait que la diminution de la concentration de D-sérine soit restreinte à l'hippocampe peut expliquer la divergence de résultats car l'étude de Hashimoto et al. (1993b) a été réalisée sur extraits de cerveaux entiers (Potier et al., 2010, Turpin et al., 2011).

Récemment, Haxaire et al. (2012) ont montré que cette altération dans la synthèse de la D-sérine par la sérine racémase ainsi que sa diminution de concentration peuvent être restaurée par un traitement chronique de N-acétyl-L-cystéine (L-NAC) chez les rats âgés. Chez ces rats, le stress oxydant responsable de l'accumulation de radicaux libres contribuant à des déficits de la mémorisation est diminué. Cette étude relie directement les altérations observées dans le métabolisme de la D-sérine et le stress oxydant responsable de nombreuses modifications durant le vieillissement, la sérine racémase étant identifiée comme une cible principale pour les effets délétères du stress oxydant lié à l'âge.

Selon la souche de rats utilisés, les résultats trouvés peuvent différer. Contrairement aux autres souches de rats telles que Wistar ou Sprague-Dawley, la souche de rats Lou/C/Jall est considérée comme un modèle de vieillissement sain car elle ne présente pas d'altération de la mémoire. Bien que les rats Lou/C/Jall possèdent une réduction significative de l'expression des récepteurs NMDA, ils n'ont aucune modification de l'expression de la sérine racémase et de la concentration de D-sérine. Ces résultats renforcent les résultats trouvés chez les autres souches de rats montrant une relation entre un déficit de l'expression de la sérine racémase et des altérations dans les processus de mémorisation (Turpin et al., 2011).

La différence d'altération observée selon la souche de rat représente deux types de vieillissement tous deux considérés comme vieillissement physiologique, avec ou sans déficits mnésiques. On peut tout de même se demander si les déficits mnésiques sont réellement physiologiques ou est ce qu'on peut les considérer comme pathologiques ? Cela montre notamment qu'il est important de tenir compte de cette variabilité et de ne pas oublier qu'elle pourrait refléter la diversité présente dans la population humaine.

D. Implications pathologiques de la D-sérine

Une des différences majeures entre le vieillissement normal et le vieillissement pathologique est la perte de neurone. De nombreuses pathologies neurodégénératives apparaissent plus fréquemment lors du vieillissement. La D-sérine n'est pas seulement un transmetteur impliqué dans des fonctions physiologiques, elle est également impliquée dans plusieurs de ces pathologies neurodégénératives où sa concentration se trouve augmentée. La D-sérine se trouve également impliquée dans une maladie psychiatrique, la schizophrénie, apparaissant quant à elle à l'adolescence, et caractérisée par une diminution de concentration de D-sérine.

1. L'excitotoxicité

Le glutamate est le principal acide aminé exciteur du système nerveux central des mammifères. Plus de 50% des neurones sont glutamatergiques. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la mémoire, l'apprentissage, la cognition mais aussi le développement du système nerveux central comme le développement et l'élimination des synapses, la migration cellulaire. Il est également impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique. Le glutamate peut se fixer sur deux grandes classes de récepteurs : 1) les récepteurs ionotropiques comme le récepteurs NMDA, kainate et AMPA. 2) les récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G (Salinska et al., 2005).

En 1957, les effets toxiques du glutamate ont été décrits pour la première fois. Une dégénération a été observée dans les couches internes de la rétine chez des souris après une injection sous cutanée de glutamate (Lucas and Newhouse, 1957). Le concept d'excitotoxicité a été proposé en premier par le Dr Olney en 1969 comme un effet toxique dû à l'activation excessive ou prolongée des récepteurs par des acides aminés exciteurs (Olney, 1969). Choi (1987) a identifié l'entrée de calcium comme un processus clé de l'excitotoxicité et a désigné les récepteurs NMDA comme la source primaire de cet influx toxique de calcium.

1.1 Mécanismes de l'excitotoxicité

Les mécanismes intracellulaires responsables de l'excitotoxicité ont été en partie identifiés. L'excitotoxicité n'aboutit pas à une voie unique de mort neuronale. Mais elle peut produire une apoptose, une nécrose ou une autophagie (Golstein and Kroemer, 2007, Shacka et al., 2007). L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un ensemble de processus morphologiques aboutissant à une autodestruction cellulaire contrôlée. Elle est caractérisée par la formation de protubérances membranaires, une perte de volume cellulaire, une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN, une inversion des feuillettes membranaires avec externalisation des phosphatidylsérines sans perte de l'intégrité membranaire, une protéolyse contrôlée et enfin par la formation de corps apoptotiques et phagocytose par les macrophages sans réaction inflammatoire (Cardoso et al., 2008, Morales-Garcia et al., 2009). La nécrose, longtemps considérée comme non contrôlée, est de plus en plus envisagée également comme un mode de mort cellulaire régulée. Elle est caractérisée par un gonflement cellulaire, une perte de l'intégrité membranaire, une libération du contenu cellulaire, une lyse de la chromatine, une phagocytose tardive et contrairement à l'apoptose, elle est accompagnée de phénomènes inflammatoires (Golstein and Kroemer, 2007, Cardoso et al., 2008). L'autophagie, pour sa part, est utilisée par les cellules pour recycler ses composants mais également comme voie de mort cellulaire. Elle est définie par une vacuolisation du cytoplasme et la formation de vésicules autophagiques (Nicoletti et al., 2008). L'activation des récepteurs NMDA par des excitotoxines peut activer des voies différentes mais toutes liées entre elles et conduisant au même résultat, la mort neuronale.

Tout d'abord, les mouvements d'ions sont au centre des processus excitotoxiques, particulièrement les flux de calcium. Une activation prolongée des récepteurs

glutamatergiques conduit à une surcharge de Ca^{2+} et de Na^+ dans les neurones postsynaptiques (Sattler et al., 1998). Les modifications suivant l'entrée de calcium après une application de glutamate ont été élucidées par Randall and Thayer (1992). Trois phases distinctes de modification de la concentration intracellulaire de calcium ont lieu dans des cultures de neurones d'hippocampe. La première est une phase d'augmentation de la concentration intracellulaire durant 5 à 10 minutes. La seconde est une phase latente de 2 heures avec des concentrations normales de calcium. La troisième et dernière phase est une phase d'augmentation graduelle soutenue associée avec la mort des cellules. Cette surcharge de calcium peut également déclencher une libération persistante de calcium par les mitochondries et activer des fonctions délétères pour les cellules comme une dysfonction mitochondriale, une activation de la nitric oxide synthase (NOS) ou une activation des protéases sensibles au calcium (Lau and Tymianski, 2010). Les mouvements de chlore sont aussi un composant central de l'excitotoxicité aiguë. Une dépolarisation excessive de la membrane postsynaptique peut entraîner un déséquilibre osmotique qui est contré par un influx de Cl^- , Na^+ et eau et éventuellement d'une lyse de la cellule. Le Na-K-Cl isoforme transporter 1 (NKCC1) contribue également aux mouvements de chlore pendant l'excitotoxicité (Russell, 2000). Ces modifications des mouvements ioniques entraînent des dysfonctionnements dans plusieurs organelles cellulaires comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou les lysosomes.

Les mitochondries peuvent donc voir leur fonctionnement altéré. L'application de NMDA sur des cultures de cellules granulaires de cervelet génère une augmentation proportionnelle à la dose appliquée d'ions superoxyde par les mitochondries (Lafon-Cazal et al., 1993). Reynolds and Hastings (1995) ont observé, à partir de cultures corticales, une augmentation des radicaux libres produits par la mitochondrie suite à l'application de NMDA et proposé que cette production soit reliée à l'entrée de calcium dans les cellules. La suppression de calcium extracellulaire atténue la production de radicaux libres en réponse à l'application de NMDA sur cultures de cellules corticales (Dugan et al., 1995).

Des perturbations du réticulum endoplasmique peuvent être également présentes. Plusieurs études suggèrent qu'un excès de calcium intracellulaire et une production excessive de NO conduisent à une déplétion du calcium dans le réticulum endoplasmique et donc à un stress. Le NO induit la S-nitrosylation de la protéine disulphide isomérase, une enzyme qui empêche l'accumulation de protéines et permet leur maturation et leur transport et protège de la neurotoxicité. La S-nitrosylation diminue l'activité de la disulphide isomérase et provoque un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Uehara et al., 2006).

Les lysosomes contiennent les enzymes nécessaires à la digestion intracellulaire. Une libération incontrôlée du contenu des lysosomes dans le cytoplasme conduit à la mort cellulaire par nécrose. Des protéines lysosomales comme la cathepsine E sont augmentées dans l'excitotoxicité (Tominaga et al., 1998). L'autophagie est un processus par lequel les organelles cytoplasmiques et les protéines à longue vie sont délivrées aux lysosomes pour être dégradés. L'apoptose et l'autophagie sont liées. L'apoptose est accompagnée dans sa phase précoce par une augmentation des compartiments lysosomaux (Gonzalez-Polo et al., 2005, Turk and Turk, 2009). La mort neuronale par autophagie et par apoptose sont activées dans l'excitotoxicité (Wang et al., 2008) impliquant ainsi les lysosomes.

Ces dysfonctionnements présents dans plusieurs organelles de la cellule conduisent à des altérations dans les voies de signalisation intracellulaire.

La voie de production du monoxyde d'azote (NO) est également impliquée dans l'excitotoxicité (Dawson et al., 1991). La nNOS, un des isoformes de l'enzymes de synthèse du NO, a été identifiée comme responsable de la production de NO impliqué dans la neurodégénérescence excitotoxique grâce à des souris KO pour la nNOS (Dawson et al., 1996). Dans cet article, un modèle est proposé pour l'activation de la nNOS. Les récepteurs NMDA lient la sous unité PSD95 par le domaine PDZ-1 du domaine C-terminal de leur sous unité NR2B, et la PSD95 lie elle-même la nNOS par le domaine PDZ-2 de son domaine N-terminal. La NOS est ainsi maintenue à proximité des récepteurs NMDA et est exposée directement à l'influx de calcium provoqué par l'activation de ces récepteurs. Le NO peut également interagir avec l'ion superoxyde pour former du peroxynitrite. Celui-ci peut causer la nitration et l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides et des dommages directs de l'ADN (Radi et al., 1991a, b).

La formation de radicaux libres par la mitochondrie produit du stress oxydant. Celui-ci est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le niveau d'antioxydant, cela a pour conséquence de faire dysfonctionner la mitochondrie dans laquelle le NO a plusieurs cibles: la chaîne de transport des électrons, les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques, les cardiolipines, les phospholipides spécifiques de la mitochondrie et l'ADN (Chaturvedi and Beal, 2008).

Des protéases sont activées notamment les calpaines, des protéases dépendantes du calcium, ou les caspases (Takano et al., 2005). Le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) est localisé dans l'espace intermembranaire des mitochondries en condition physiologique. Lors de l'excitotoxicité, les calpaines induisent la libération du facteur AIF par la mitochondrie et ainsi l'activation de l'apoptose (Polster et al., 2005). Les calpaines peuvent aussi couper des protéines de régulation de l'apoptose comme Bax (Gao and Dou, 2000) ou Bid (Mandic et al., 2002). La voie de mort dépendante des caspases est activée par la libération de cytochrome c par la mitochondrie. Lors de l'excitotoxicité, la perméabilité de la mitochondrie est modifiée et permet la libération de cytochrome c (Mattson, 2003).

Des facteurs de transcription tels que le Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B) sont associés à l'excitotoxicité (Qin et al., 1998). La stimulation des récepteurs NMDA active NF- κ B qui a un rôle pro-apoptotique par la dégradation de son inhibiteur I κ B- α (Qin et al., 2001). Le facteur de transcription Forkhead box protein O (FOXO) est également activé tout comme p53. Ces facteurs de transcription activent des gènes pro-apoptotiques comme Bim, FOXO1, Bid, Apaf1 ou Bax (Vousden, 2000, Dick and Bading, 2010).

Tous ces mécanismes aboutissent à la mort neuronale (figure 9). De nombreuses pathologies neurodégénératives sont concernées par la présence de cette mort neuronale par excitotoxicité.

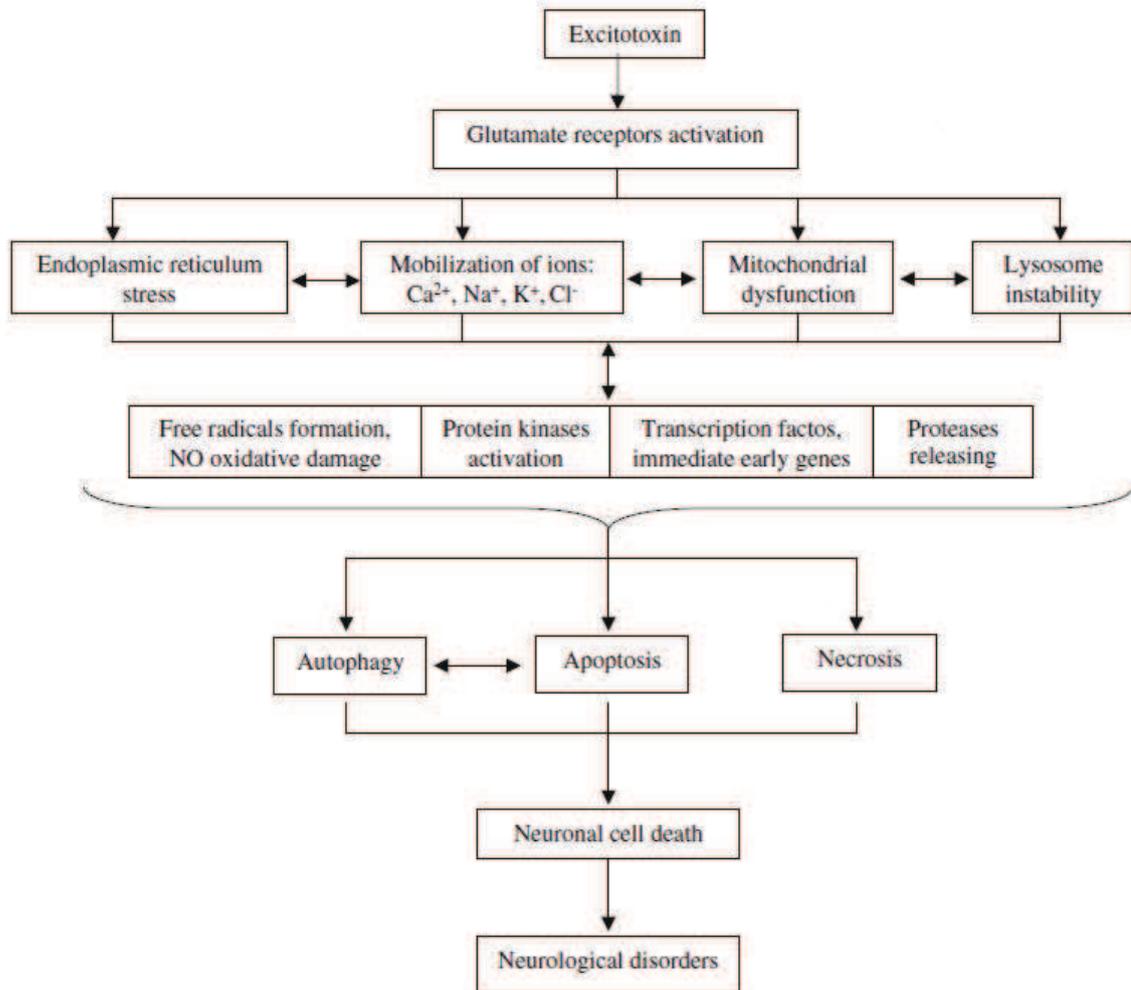


Figure 9 : Schéma récapitulatif des mécanismes de l'excitotoxicité. De nombreuses organelles et protéines sont impliquées dans les voies menant à la mort des neurones par suractivation des récepteurs au glutamate. Cette mort neuronale excessive conduit à de nombreuses pathologies neurodégénératives (Wang and Qin, 2010).

1.2 L'excitotoxicité est-elle déclenchée par l'implication préférentielle des récepteurs NMDA synaptiques ou extrasynaptiques ?

Le sous type de la sous unité n'influence pas seulement la localisation du récepteur NMDA mais également ses propriétés fonctionnelles. Les propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques sont aussi différentes et couplées à des voies de signalisation différentes.

Des essais cliniques avec administration d'antagonistes des récepteurs NMDA chez des humains ayant subi un traumatisme crânien ont été testés pour prévenir la mort neuronale et conférer une neuroprotection. L'administration d'antagoniste des récepteurs NMDA s'est révélée inefficace. Ikonomidou and Turski (2002) ont émis l'hypothèse que le glutamate peut être augmenté et être neurotoxique dans la phase aiguë suivant le traumatisme crânien ou

l'ischémie. En revanche, après cette période, le glutamate reprend ses fonctions normales et favorise la survie neuronale. Cette hypothèse est basée sur les observations que l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA entre 1h et 7h après le traumatisme est nuisible tandis que l'administration des antagonistes est protectrice lorsqu'ils sont donnés avant le traumatisme (Ikonomidou et al., 2000). Une autre étude a montré qu'un traitement à base d'antagonistes des récepteurs NMDA donné en retard supprime la neurogénèse ayant lieu après une ischémie cérébrale dans l'hippocampe (Arvidsson et al., 2001). Le glutamate pourrait donc à la fois induire la mort neuronale par excitotoxicité immédiatement après le traumatisme et faciliter la réparation dans un délai un peu plus long (Ikonomidou and Turski, 2002).

Hardingham et al. (2002) se sont intéressés aux gènes régulés par la transmission synaptique glutamatergique. Ils ont montré qu'une stimulation de l'activité synaptique et des récepteurs NMDA synaptiques active la protéine CREB (cAMP response element-binding protein) et ses cibles. CREB est un facteur de transcription régulant notamment la transcription du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) qui favorise la survie des neurones (Montminy and Bilezikjian, 1987). Leurs résultats mettent en évidence que les récepteurs NMDA extrasynaptiques sont couplés à une voie d'inactivation de CREB et donc favorise la mort neuronale. Ils suggèrent deux voies de fonctionnement distinctes pour les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques. Leveille et al. (2008) confirment ces deux voies de fonctionnement sur des cultures de neurones corticaux de souris. Ils montrent que l'activation des récepteurs synaptiques et extrasynaptiques produit dans les deux cas une augmentation de calcium intracellulaire mais que les voies de signalisation activées en aval sont différentes. L'augmentation de calcium intracellulaire n'est pas neurotoxique lorsqu'elle provient de l'activation des récepteurs synaptiques, en revanche elle conduit à la mort neuronale lorsqu'elle provient des récepteurs extrasynaptiques.

Cette dualité du récepteur NMDA influencé par sa localisation est appelée le paradoxe NMDA. Une hypoactivation des récepteurs NMDA synaptiques est délétère pour les neurones. Une augmentation de l'activité de ces récepteurs déclenche l'activation de voies de signalisation neuroprotectrices et engendre la survie neuronale. En revanche, la faible activation des récepteurs extrasynaptiques n'a pas de conséquences pour les neurones tandis qu'une forte activation engendre des voies de signalisation excitotoxiques (figure 10, Hardingham and Bading, 2010).

L'activation des récepteurs NMDA synaptiques engendre l'expression des gènes anti-apoptotiques, des signaux de survie, des systèmes antioxydants (glutathione), le système thioredoxine/peroxyredoxine et l'expression des gènes activant la survie (Papadia et al., 2008, Lau and Bading, 2009, Leveille et al., 2010). En même temps, l'expression des gènes pro-apoptotiques est inhibée (Dick and Bading, 2010). Il en résulte des effets anti-apoptotiques et une augmentation des défenses antioxydantes ainsi qu'un fonctionnement mitochondrial physiologique. Tout cela conduit à la survie des neurones (figure 11, Hardingham and Bading, 2010).

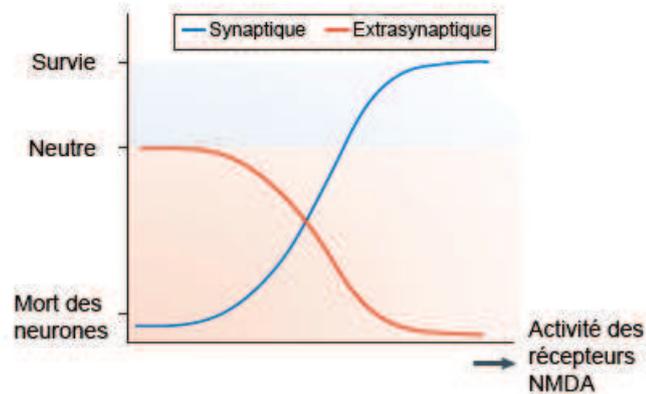


Figure 10 : Schéma des effets opposés des récepteurs NMDA.

Une forte activation des récepteurs NMDA synaptiques favorise la survie des neurones. En revanche une forte activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques engendre la mort des neurones. Une sous activation des récepteurs synaptiques est également délétère pour les neurones tandis qu'une faible activation des récepteurs extrasynaptiques n'a pas de conséquence pour les neurones. (D'après Hardingham and Bading, 2010).

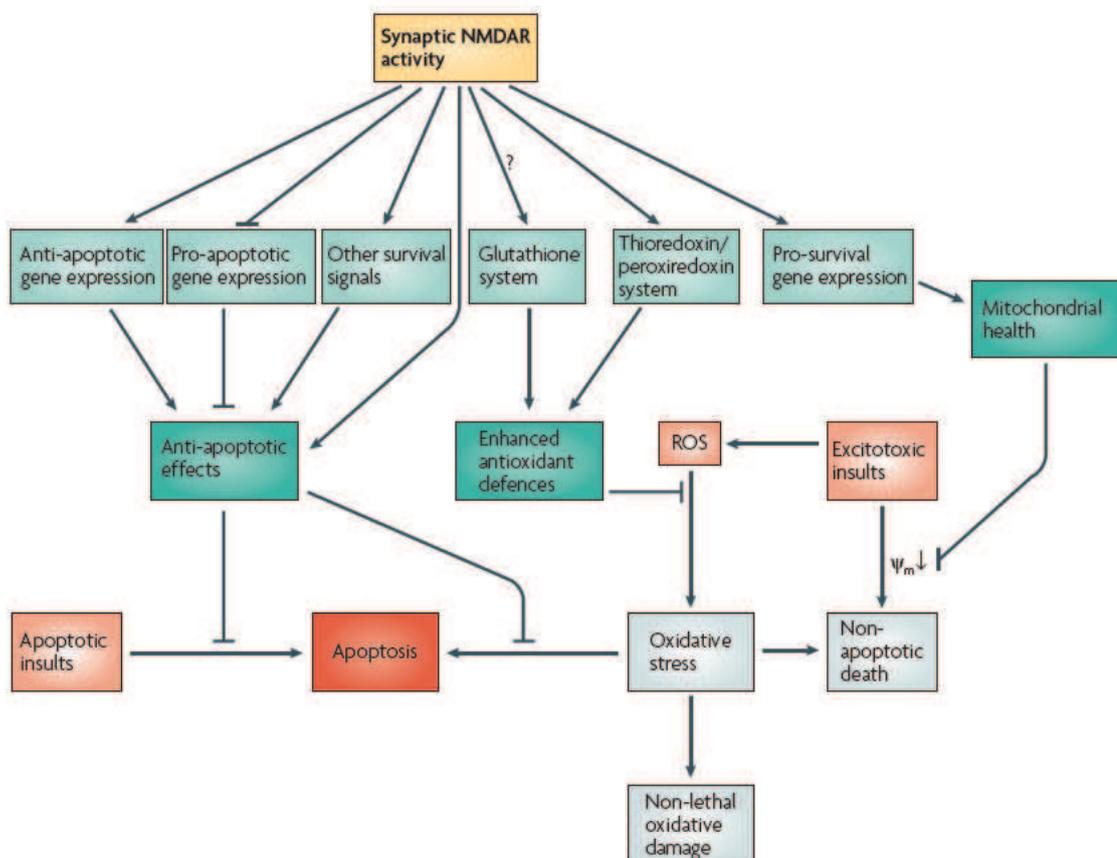


Figure 11 : Les voies de neuroprotection activées par les récepteurs NMDA synaptiques (Hardingham and Bading, 2010).

L'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques active le facteur de transcription FOXO qui va activer des voies de signalisation pro-apoptotiques (Dick and Bading, 2010). Le potentiel de membrane des mitochondries est perturbé (Leveille et al., 2008). La protéine Jacob est activée et va inhiber la voie de signalisation de CREB (Dieterich et al., 2008). Les calpaines sont également activées et vont inhiber la protéine STEP qui est elle-même une inhibitrice de p38 qui est pro-apoptotique (Kawasaki et al., 1997, Xu et al., 2009). L'activation de ERK1/2 est également inhibée (Ivanov et al., 2006, Leveille et al., 2008). Ainsi l'activation des récepteurs extrasynaptiques conduit à l'apoptose (figure 12, Hardingham and Bading, 2010).

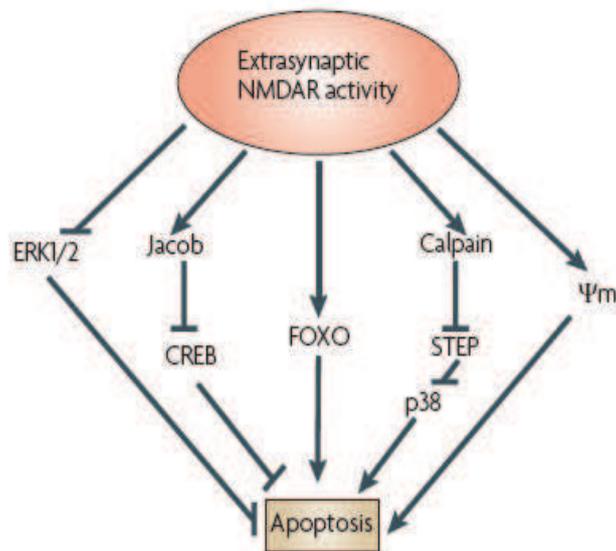


Figure 12 : Schéma des voies de signalisation activées et inhibées par l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Hardingham and Bading, 2010).

Récemment, Papouin et al. (2012) ont émis une toute autre hypothèse concernant l'origine de l'excitotoxicité. Ils montrent que la D-sérine est le co-agoniste impliqué dans l'excitotoxicité. La D-sérine est également le co-agoniste endogène des récepteurs synaptiques. Les auteurs concluent de ces résultats que l'excitotoxicité est médiée par les récepteurs synaptiques. Ce résultat est surprenant car il contredit les recherches sur la dualité des récepteurs NMDA de ces dernières années. Une autre équipe a également démontré que l'activation des récepteurs synaptiques sur cultures de cellules en condition hypoxiques induit de la mort neuronale excitotoxique (Wroge et al., 2012).

1.3 Antagonistes

L'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA chez les humains suite à un traumatisme crânien s'est révélée inefficace (Ikonomidou and Turski, 2002). Ces

antagonistes, tel que le MK-801, confèrent une neuroprotection dans un premier temps puis exacerbent l'excitotoxicité dans un second temps (Pohl et al., 1999). Suite aux études montrant le paradoxe du récepteur NMDA, des équipes se sont intéressées à la stratégie consistant à utiliser des antagonistes spécifiques des récepteurs extrasynaptiques pour bloquer uniquement l'excitotoxicité.

La mémantine est un des antagonistes des récepteurs NMDA extrasynaptiques le plus étudié. La mémantine est un dérivé de l'amantadine, un puissant antigrippal synthétisé pour la première fois en 1968. A l'origine, elle a été utilisée comme traitement chez des patients parkinsoniens. Il a été montré qu'en réalité elle n'est ni dopaminergique ni anticholinergique mais qu'elle est un antagoniste des récepteurs NMDA (Chen et al., 1992, Pellegrini and Lipton, 1993). Elle se lie sur ou à côté du site de fixation du magnésium sur les récepteurs NMDA (Chen and Lipton, 1997) et agit comme un bloqueur des récepteurs NMDA activés en présence de concentrations élevées et prolongées de glutamate. En revanche, elle est inactive lorsque les concentrations de glutamate sont élevées pendant quelques millisecondes comme lors de la transmission synaptique (Chen et al., 1998). La mémantine bloque de préférence les récepteurs extrasynaptiques activés (Leveille et al., 2008, Okamoto et al., 2009, Xia et al., 2010).

De nombreuses équipes ont démontré son efficacité *in vitro* et *in vivo* dans le traitement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Bordji et al., 2010), la maladie de Huntington (Milnerwood et al., 2010), le traumatisme crânien (Rao et al., 2001). Son utilisation chez des patients parkinsoniens a permis de voir qu'elle est très bien tolérée et qu'elle peut ainsi être envisagée pour des traitements de pathologies concernées par de l'excitotoxicité. Son utilisation a été approuvée en 2003 par l'union européenne et par les autorités sanitaires américaines (US FDA) pour le traitement de la maladie d'Alzheimer des cas modérés à sévères (Lipton, 2006).

Il existe d'autres antagonistes spécifiques des récepteurs NMDA extrasynaptiques mais ceux-ci ne sont pour l'instant pas utilisés en clinique. L'ifenprodil se lie préférentiellement aux récepteurs contenant les sous unités NR1/NR2B (Williams, 1993). Il a une action protectrice sur des modèles animaux de traumatisme crânien (Okiyama et al., 1997, Dempsey et al., 2000). Les mécanismes d'action de l'ifenprodil ne sont pas encore bien déterminés (Williams, 2001, Bhatt et al., 2012). Un de ses mécanismes d'action semble être l'inhibition du récepteur en le rendant plus sensible à l'inhibition par les protons, (Mott et al., 1998). De plus, l'ifenprodil diminue le temps et la fréquence d'ouverture du canal de façon pH dépendante car cela est vrai à pH 7,4 mais pas pH 7,9 (Amico-Ruvio et al., 2012, Bhatt et al., 2012).

L'hypothèse que l'excitotoxicité est médiée par les récepteurs synaptiques (Papouin et al., 2012, Wroge et al., 2012) est en opposition avec la neuroprotection obtenue par l'application d'antagonistes spécifiques des récepteurs extrasynaptiques tel que la mémantine. Pour Wroge et al. (2012) la mémantine bloque également les récepteurs synaptiques et la neuroprotection qu'elle confère vient du blocage des récepteurs synaptiques excessivement activés. D'autres études sont nécessaires pour valider ou infirmer l'implication des récepteurs extrasynaptiques dans l'excitotoxicité.

1.4 Implication de la D-sérine dans l'excitotoxicité

Plusieurs études ont montré que l'application d'antagonistes du site glycine sur les récepteurs NMDA protège de la mort neuronale (Foster et al., 1990, Patel et al., 1990). Ainsi, d'autres études se sont intéressées au rôle des agonistes du site glycine. L'une d'entre elles a montré que la D-sérine joue un rôle dans la neurotoxicité induite par les récepteurs NMDA sur des tranches organotypiques d'hippocampe. La glycine en revanche ne joue pas de rôle dans la neurotoxicité dans ce modèle, indiquant que la D-sérine est nécessaire et le co-agoniste prédominant dans la mort des neurones (Shleper et al., 2005). Elle joue également un rôle dans l'excitotoxicité *in vivo*. La D-sérine et la glycine sont impliquées dans les dommages excitotoxiques des cellules ganglionnaires de la rétine *in vivo* mais avec des contributions différentes. La D-sérine exacerbe la toxicité NMDA dépendante dans toutes les aires de la rétine tandis que la glycine a un effet seulement périphérique (Hama et al., 2006). De plus, des souris KO pour la sérine racémase, présentant une diminution de la concentration extracellulaire de D-sérine de 90%, ont une réduction de la neurotoxicité induite par les récepteurs NMDA suite à des injections de NMDA dans le télencéphale (Inoue et al., 2008). Papouin et al. (2012) appliquent de la RgDAAO qui dégrade spécifiquement la D-sérine et/ou de la BsGO qui dégrade spécifiquement la glycine sur des tranches d'hippocampe exposées à du NMDA. Les auteurs montrent que la RgDAAO et non la BsGo protège de l'excitotoxicité et donc que la D-sérine et non la glycine est le co-agoniste impliqué dans l'excitotoxicité.

2. Implication dans des pathologies neurodégénératives

L'excitotoxicité est présente dans de nombreuses pathologies neurodégénératives. Une implication de la D-sérine dans l'excitotoxicité semble de plus en plus évidente. Durant ces dernières années, le rôle de la D-sérine dans les pathologies neurodégénératives est de plus en plus étudié.

2.1 Implication de la D-sérine dans la sclérose latérale amyotrophique

2.1.1 Description

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la plus commune des pathologies neuromusculaires. Elle a une incidence de 1-2/100 000 par an. Elle a été décrite en 1869 par Jean-Martin Charcot d'où son appellation de maladie de Charcot. Elle se caractérise par une perte massive des motoneurones de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cortex causant progressivement une fragilité musculaire, une atrophie et une paralysie conduisant à une incapacité sévère. La maladie progresse rapidement conduisant à une mort par arrêt respiratoire. Une gliose est également observée autour des neurones en dégénérescence dans la corne ventrale de la moelle épinière (Bruijn et al., 2004, Paul and de Bellerocche, 2012). Il existe deux formes de la maladie, la forme sporadique (90%) et la forme familiale (10%). Environ 20% des cas héréditaires possèdent une mutation du gène codant pour la superoxyde

dismutase 1 (SOD1). Cette mutation est très étudiée pour comprendre les mécanismes conduisant à la SLA. La SLA est considérée comme une pathologie multifactorielle. Plusieurs causes sont envisagées comme le stress oxydant, l'inflammation, une désorganisation des neurofilaments. L'excitotoxicité médiée par les récepteurs glutamatergiques est également très étudiée et considérée comme une cause principale de la dégénérescence des motoneurons (Bruijn et al., 2004, Van Damme et al., 2005). Cette hypothèse est étayée par le fait que l'administration de riluzole, un inhibiteur de la libération de glutamate ralentit la progression de la maladie. Sachant que le récepteur NMDA nécessite la fixation d'un de ses co-agonistes la glycine ou la D-sérine, leur rôle est également envisagé dans la maladie.

2.1.2 Implication de la D-sérine et de ses enzymes de synthèse et de dégradation dans la SLA

Un rôle de la D-sérine plutôt que de la glycine a été en premier envisagé par Sasabe et al. (2007) dans la SLA suite notamment aux travaux de Shleper et al. (2005). Sasabe et al. (2007) ont tout d'abord réalisé des marquages immunofluorescents de la D-sérine chez un modèle de SLA chez la souris G93A-SOD1. Ils ont ainsi montré une élévation de la concentration de D-sérine au cours de la progression de la maladie et une association de cette élévation avec une activation de la glie. Les auteurs confirment l'hypothèse d'un rôle de la D-sérine dans l'augmentation de la toxicité par les récepteurs NMDA médiée par l'activation d'ERK1/2 et de la MAPK p38. Ils montrent également une surexpression de la sérine racémase dans la microglie réactive et supposent que l'élévation des niveaux de D-sérine peut être causée par un déséquilibre entre la production de D-sérine dans la microglie réactive et la recapture et dégradation par les astrocytes. Après avoir étudié la SLA chez les souris transgéniques, les auteurs ont réalisé des marquages postmortem de la D-sérine et de la sérine racémase chez des humains ayant la maladie. Ils ont mis en évidence une augmentation de la D-sérine ainsi qu'une augmentation de la sérine racémase dans des cellules non neuronales. Ces marquages immunohistochimiques confirment les précédents résultats trouvés chez les souris SLA. Ces résultats concernent aussi bien la forme sporadique que la forme familiale de la SLA. La présence de la sérine racémase dans les cellules non neuronales à la fois chez les souris transgéniques et dans les marquages postmortem est surprenante et non discutée par rapport aux données actuelles (Kartvelishvily et al., 2006, Yoshikawa et al., 2007, Miya et al., 2008, Benneyworth et al., 2012). En collaboration avec notre laboratoire, Thompson et al. (2012) ont étudié le rôle de la D-sérine dans la SLA chez des souris G39A-ALS en utilisant deux approches différentes. Premièrement, ils utilisent des souris KO pour la sérine racémase ($Srr^{-/-}$) croisées à des souris G39A-ALS et montrent que les souris résultant de ce croisement développent plus vite les symptômes de la SLA mais survivent plus longtemps, cela étant sûrement lié à une perte de fonction motrice ralentie due à la délétion de la sérine racémase. Deuxièmement, les auteurs administrent de la D-sérine à des souris G39A-ALS et observent une apparition de la maladie plus rapide mais une progression lente. Ces résultats confirment que la sérine racémase et la D-sérine sont impliquées dans le développement et la progression de la sclérose latérale amyotrophique.

Concernant les enzymes de synthèse et de dégradation de la D-sérine, la sérine racémase n'est pas la seule à être impliquée. La DAAO est fortement présente dans la matière grise de la moelle épinière. Des souris mutantes pour la DAAO possèdent des niveaux de D-sérine élevés dans le CNS (Maekawa et al., 2005) et présentent des courants post-synaptiques augmentés dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Wake et al., 2001). Ces résultats ont amené d'autres équipes à s'interroger sur un rôle potentiel de la DAAO dans la SLA. Une mutation (R199W) de la DAAO a été identifiée comme étant associée à la forme familiale de la maladie (Mitchell et al., 2010). Cette mutation conduit à une réduction de l'activité de la DAAO mais également la formation d'agrégats d'ubiquitine, à l'altération de la survie cellulaire et à l'augmentation de l'apoptose dans les neurones. Dans le but d'étudier si l'inactivation de la DAAO affecte le phénotype des motoneurons *in vivo*, des souris mutantes $B_6DAO^{-/-}$ ont été développées par croisement de souris C57BL/6J et ddY/DAO⁻ (Sasabe et al., 2012). Les souris $B_6DAO^{-/-}$ ont des réflexes anormaux caractérisés par une rétraction des membres inférieurs vers le tronc lorsqu'elles sont suspendues par la queue. Le nombre de motoneurons de la corne lombaire ventrale est réduit avec une morphologie de dégénération. La perte de l'activité de la DAAO semble ainsi conduire à la dégénérescence des motoneurons. De plus, les auteurs démontrent que l'activité de la DAAO est supprimée dans les astrocytes réactifs du tractus réticulospinal des souris G93A-SOD1 (appelée aussi mSOD1), que la diminution de la dégradation de la D-sérine par l'inactivation de la DAAO contribue à son accumulation et dernièrement que la diminution d'activité de la DAAO est due à la répression de l'expression du gène de la DAAO médiée par la voie des récepteurs NMDA et de la protéine ERK.

Paul and de Belleruche (2012) proposent un modèle schématisant l'implication de la D-sérine dans la sclérose latérale amyotrophique. Dans cette pathologie, la D-sérine est élevée soit à cause d'une augmentation de la sérine racémase due à un stress cellulaire, à de l'inflammation, à un excès de glutamate, soit d'une diminution de la DAAO. L'augmentation de l'activité de la sérine racémase conduit à une élévation de la D-sérine qui va ensuite être libérée dans la synapse. La D-sérine peut être transportée dans les neurones et les cellules gliales par les transporteurs de la D-sérine Asc-1 et ASCT2. La D-sérine et le glutamate vont activer les récepteurs NMDA présents sur les neurones moteurs, conduire à l'excitotoxicité et à la mort des neurones.

2.2 Implication de la D-sérine dans la maladie d'Alzheimer

2.2.1 Description

La maladie d'Alzheimer est une des maladies neurodégénératives intraitables les plus courantes. Elle peut être sporadique ou familiale, causée par une mutation génétique rare. Au niveau neuro-anatomique, la maladie d'Alzheimer est définie par l'existence de plaques amyloïde correspondant à l'accumulation du peptide β amyloïde ($A\beta$) et par des amas de dégénérescence neurofibrillaires dus à une hyperphosphorylation de la protéine tau (Hemar and Mulle, 2011). Les hypothèses actuelles supposent que le peptide β amyloïde s'accumule et conduit à une neurodégénérescence (Hardy and Selkoe, 2002). Les récepteurs NMDA

semblent également impliqués dans la maladie (Jansen et al., 1990). Ainsi, le peptide β amyloïde peut engendrer de la neurotoxicité en diminuant le blocage des récepteurs NMDA par l'ion magnésium et en augmentant ainsi l'influx de calcium (Suh and Checler, 2002). De plus, l'application d'un antagoniste du récepteur NMDA peut restaurer la transmission synaptique déficiente chez un modèle de souris Alzheimer (Fitzjohn et al., 2001).

2.2.2 Implication de la D-sérine

Une première étude en 1993 s'est intéressée à la concentration de la D-sérine dans la maladie d'Alzheimer. La D-sérine a été mesurée par spectrométrie de masse dans le cortex temporal de patients Alzheimer postmortem sans révéler de différence significative (Chouinard et al., 1993). D'autres études ont également mesuré la D-sérine dans le cortex pariétal, préfrontal, frontal et n'ont révélé aucune différences significatives entre les patients Alzheimer et contrôles (Kumashiro et al., 1995, Nagata et al., 1995).

En revanche, des mesures dans le liquide cébrospinal ventriculaire ont montré des niveaux de D-sérine significativement plus élevés chez des patients Alzheimer comparés à des patients contrôles (Fisher et al., 1998). Enfin, dans le sérum, des études contradictoires ont révélé soit une diminution des niveaux totaux de sérine avec une élévation de la L-sérine et une diminution de D-sérine (Molina et al., 1998, Hashimoto et al., 2004) soit une augmentation de D-sérine (Fisher et al., 1998).

Le peptide $A\beta$ est pro-inflammatoire et peut activer la microglie, augmenter l'expression de cytokines, la production de NO, d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que la libération de glutamate (Meda et al., 1995, McDonald et al., 1997, Barger and Basile, 2001). L'équipe de Wu et al. (2004) a caractérisé l'influence de l'inflammation sur la synthèse et/ou la libération de D-sérine par les cellules microgliales. Le traitement de culture de cellules gliales par le peptide $A\beta$ augmente la concentration et la libération de D-sérine, ainsi qu'une augmentation de l'ARNm et de la protéine sérine racémase. La D-sérine, libérée par des cellules microgliales traitées au préalable par de l' $A\beta$, augmente la neurotoxicité de neurones d'hippocampe en culture. En présence de DAAO, la neurotoxicité est diminuée. L'observation de tissu de cerveau de patient Alzheimer montre également que l'ARNm de la sérine racémase est élevé. Le traitement de cellules microgliales en culture par le précurseur de la protéine amyloïde (APP) induit également l'expression de la sérine racémase et la libération de D-sérine par ces cellules microgliales (Wu et al., 2007). On peut se demander si l'expression de la sérine racémase dans les cellules gliales est due aux conditions de culture ou si elle est le reflet d'un dysfonctionnement pathologique. Ces résultats montrent donc une implication de la D-sérine dans la maladie d'Alzheimer confirmée par l'inhibition des lésions neuronales induites par l' $A\beta$ chez des souris KO pour la sérine racémase (Inoue et al., 2008).

Les mesures effectuées postmortem ont été uniquement faites dans le cortex. Il pourrait être pertinent d'effectuer des mesures de D-sérine dans d'autres zones comme par exemple l'hippocampe car c'est une des structures principalement atteintes dans la maladie d'Alzheimer. Le point positif des mesures effectuées dans le liquide cébrospinal est qu'elles ont pu être réalisées chez des patients et non en post-mortem. En revanche, les résultats obtenus sont contradictoires. D'après les études sur cultures de cellules, les niveaux de D-

sérine semblent augmentés. D'autres études sont nécessaires pour clarifier *in vivo* le rôle de la D-sérine dans la maladie d'Alzheimer et confirmer les résultats obtenus *in vitro*.

2.3 Implication dans la maladie de Parkinson

2.3.1 Description

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Ses symptômes cliniques sont un ralentissement des mouvements (akinésie), des tremblements, des troubles de l'équilibre, une rigidification du tronc et des membres. De plus, les patients peuvent aussi être dépressifs et avoir des déficits cognitifs. Des troubles de l'exécution automatique des gestes sont liés à des dysfonctionnements des ganglions de la base. Les phénotypes moteurs sont principalement dus à une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*. Cette perte de neurones est accompagnée par l'accumulation d' α -synucéine appelée corps de Lewy. Une dysrégulation de la neurotransmission glutamatergique dans les ganglions de la base paraît jouer un rôle central dans les altérations motrices de la maladie. De plus, une augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire due à une diminution de recapture apparaît comme étant le point de départ d'une cascade excitotoxique conduisant à la neurodégénération dans la substance noire *pars compacta* (Caudle and Zhang, 2009). Un argument supplémentaire en faveur de l'implication de la transmission glutamatergique est l'amélioration des symptômes chez des souris ou des primates non humains, modèles de la maladie de Parkinson suite à l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA (Greenamyre et al., 1994, Starr, 1995). L'implication du glutamate et des récepteurs NMDA comme pour les pathologies précédentes amène à envisager l'implication de la D-sérine.

2.3.2 Implication de la D-sérine

Une étude ancienne a mesuré les niveaux de D-sérine par spectrométrie de masse dans du cortex temporal prélevé post-mortem chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, mais elle ne montre aucune différence significative par comparaison du cortex pariétal de cerveau control (Chouinard et al., 1993). Récemment, Lu et al. (2011) ont quantifié les niveaux de D-sérine et de sérine racémase chez une souris MPTP/p (modèle de la pathologie). Le MPTP (1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine) est une neurotoxine provoquant les symptômes de la maladie de Parkinson. Une fois injecté, le MPTP est dégradé en MPP⁺ qui va être capté par les transporteurs à dopamine, amené dans le complexe I de la mitochondrie et cela va engendrer la mort des neurones dopaminergiques. La D-sérine et la sérine racémase sont localisées dans les astrocytes et dans les neurones positifs à la tyrosine hydroxylase de la substance noire. La D-sérine est également présente dans le striatum en conditions physiologiques. Après 5 semaines de traitement au MPTP, une augmentation de la D-sérine et de la sérine racémase est observée dans les astrocytes de la substance noire et dans les neurones du striatum. En revanche, aucune augmentation n'est observée dans l'hippocampe et dans le cortex préfrontal, confirmant les résultats de Chouinard et al. (1993).

L'équipe de U. Heresco-Levy, après avoir réalisé une étude sur l'administration de D-sérine chez des patients schizophrènes (Heresco-Levy et al., 2005), a testé l'administration de D-sérine chez des patients parkinsoniens. Cette approche semble contradictoire par rapport aux résultats obtenus par Lu et al. (2011) mais envisagée du fait que des études cliniques n'ont montré aucun résultat pour l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA contrairement aux études sur modèles animaux (Johnson et al., 2009). Pendant 6 semaines, 30 mg/kg de D-sérine sont administrés oralement. Les niveaux de D-sérine sont mesurés dans le sérum des patients par HPLC. Une amélioration significative des symptômes moteurs et comportementaux a été observée (Gelfin et al., 2012). Les résultats de cette étude sont encourageants mais opposés à ceux de Lu et al. (2011). Les mécanismes d'actions par lesquels agit la D-sérine dans la maladie de Parkinson restent à identifier.

2.4 Implication de la D-sérine dans l'épilepsie

L'épilepsie est une pathologie neurologique caractérisée par des crises récurrentes spontanées et des neurones hyperexcitables. La transmission glutamatergique et les récepteurs NMDA ont été impliqués dans l'apparition et la progression de l'épilepsie (Chapman et al., 1996, Meldrum et al., 1999). Des études chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporale ont montré la présence d'une neurodégénérescence de l'hippocampe appelée aussi sclérose hippocampique. L'origine excitotoxique de la perte neuronale est supposée mais non encore démontrée chez les patients (Davies et al., 1996, Fuerst et al., 2001, Mathern et al., 2002).

Le rôle de la D-sérine n'a pas été encore réellement prouvé dans l'épilepsie, en revanche son rôle a été étudié dans le *status épilepticus* (SE) ou état de mal épileptique, phase particulière de l'épilepsie (Liu et al., 2009, Ryu et al., 2010).

2.4.1 Définition du *status épilepticus*

Le *status épilepticus* est une phase particulière de l'épilepsie, caractérisé par des crises généralisées et continues, durant plus de 30 minutes sans récupération totale de conscience entre deux crises contrairement à l'épilepsie qui se caractérise par des crises discontinues et ne pouvant concerner qu'une zone du cerveau et/ou un groupe de neurones (Chen et al., 2007). Le *status épilepticus* peut être déclenché pharmacologiquement par l'administration de pilocarpine, un agoniste des récepteurs muscariniques M1 (Hamilton et al., 1997). Il est nécessaire d'utiliser de fortes doses de pilocarpine, supérieures à 300 mg/kg pour le déclencher (Turski et al., 1983). Selon les équipes, les protocoles choisis pour induire du *status épilepticus* à l'aide de pilocarpine sont légèrement différents. Des doses variables de pilocarpine sont administrées en une seule injection allant de 300 mg/kg (Slais et al., 2008) à 380 mg/kg (Leite et al., 1990) en passant par 320 mg/kg (Covolan and Mello, 2006) et 350 mg/kg (Sanchez et al., 2009) chez le rat. En revanche, d'autres équipes injectent une dose plus faible de pilocarpine mais plusieurs fois à intervalles réguliers jusqu'à ce que le *status épilepticus* se déclenche (Parent et al., 2006, Soerensen et al., 2009). L'administration

systemique de la pilocarpine engendre des modifications comportementales et électrographiques divisées en trois groupes : (1) une période aigüe, le *status epilepticus*, qui dure 24 heures, (2) une période silencieuse avec une normalisation progressive de l'électroencéphalogramme (EEG) et du comportement. Cette période dure de 4 à 44 jours, (3) une période chronique caractérisée par des crises récurrentes spontanées (Cavalheiro, 1995).

L'induction du *status epilepticus* par la pilocarpine conduit à une perte cellulaire sévère et étendue dans de nombreuses aires du cerveau par des mécanismes excitotoxiques (Smolders et al., 1997, Aroniadou-Anderjaska et al., 2008). Des crises continues de 40 à 60 minutes sont nécessaires pour tuer les neurones dans les zones vulnérables du cerveau chez les rats (Fujikawa, 1996). La mort neuronale est causée à la fois par des processus apoptotiques et nécrotiques (Scorza et al., 2009). Les dommages, se produisant lors du *status epilepticus* conduisent à des dommages immédiats apparaissant entre quelques minutes et quelques heures après son déclenchement (Turski et al., 1983). Les dommages apparaissant dans les différentes aires du cerveau sont temps spécifiques. Les dommages initiaux apparaissent quelques heures après le début du *status epilepticus*. Les zones touchées sont le hile de l'hippocampe, les noyaux endopiriformes, le cortex piriforme, les couches superficielles des aires néocorticales et le claustrum. Huit heures après le début du *status epilepticus* les dommages s'intensifient dans les aires précédentes et atteignent le cortex enthorinal, le noyau amyloïde, le noyau ventro-médial de l'hypothalamus, le subiculum (Covolani and Mello, 2006, Scorza et al., 2009). La mort neuronale est accompagnée d'une prolifération des cellules gliales. La microglie ainsi que d'autres marqueurs de l'inflammation sont présents dans les phases précoces du *status epilepticus* (Binder and Steinhauser, 2006, Avignone et al., 2008, Sun et al., 2012).

Un effet neuroprotecteur des antagonistes des récepteurs NMDA a été observé suggérant ainsi une activation du système glutamatergique responsable de la production de dommages neuronaux bien que l'activation des récepteurs cholinergiques soit augmentée par l'administration de pilocarpine (Clifford et al., 1989, Fujikawa et al., 1994, Fujikawa, 1995, Brandt et al., 2003).

2.4.2 Implication de la D-sérine dans l'épilepsie et le *status epilepticus*

La première implication de la D-sérine dans l'épilepsie a été montrée par Singh et al. (1990). Des injections de D-sérine chez des souris potentialisent l'effet du NMDA de façon dose dépendante pour l'induction de crises épileptiques. Chez un modèle de *status epilepticus* induit par la pilocarpine chez la souris, la D-sérine a été marquée par immunohistochimie à 12 h et 24 h après l'injection de pilocarpine et observée dans plusieurs régions cérébrales. Des neurones positifs pour la D-sérine sont présents dans le cortex moteur, somatosensoriel, piriforme, cingulaire, insulaire, enthorinal, ainsi que dans CA1, CA2, CA3, le hile de l'hippocampe et dans le thalamus dorsal. Les neurones positifs pour la D-sérine ne sont pas présents 1h après l'injection mais apparaissent dans ces régions 4 h après l'injection, atteignent un pic entre 12 h et 24 h puis diminuent progressivement entre 3 et 14 jours après l'injection de pilocarpine. 98 % des neurones positifs pour la D-sérine sont également positifs pour GAD-67, indiquant qu'ils sont GABAergiques. Un double marquage D-sérine/fluorochrome, un marqueur de la souffrance neuronale, à 3 jours montre que 93% des

neurones sont doublement marqués et présentent donc des signes de souffrances et de possible dégénération. De la D-sérine est également présente dans les astrocytes dont le nombre et la densité augmente dans le modèle pilocarpine (Liu et al., 2009). Une seconde étude de la D-sérine et de la sérine racémase par immunofluorescence a été réalisée chez des rats injectés avec de la pilocarpine. Chez des rats contrôles, la sérine racémase et la D-sérine sont présentes principalement dans les astrocytes de l'hippocampe. Ces données contrôles sont étonnantes et ne tiennent pas compte des articles identifiant la sérine racémase comme neuronale (Kartvelishvily et al., 2006, Yoshikawa et al., 2007, Miya et al., 2008, Benneyworth et al., 2012). A partir de 1 jour jusqu'à 4 semaines après l'injection de pilocarpine, l'immunoréactivité de la sérine racémase et de la D-sérine augmente dans les astrocytes. Les auteurs suggèrent que les astrocytes peuvent libérer en excès de la D-sérine et ainsi générer les décharges épileptiques (Ryu et al., 2010). Harai et al. (2012) ont injecté du pentylentetrazole (PTZ), un inhibiteur GABAergique, chez des souris KO pour la sérine racémase. Ces souris possèdent une concentration de D-sérine extracellulaire plus faible que les souris contrôles et ne développent pas de crises généralisées contrairement aux souris contrôles ce qui suggère un effet anticonvulsivant de la diminution des niveaux de D-sérine.

A l'opposé, une diminution de la concentration de D-sérine peut dans certains cas induire une activité convulsive. Chez des patients avec une déficience pour la 3-phosphoglycérate déhydrogénase, enzyme de synthèse de la L-sérine, la concentration de D-sérine est quasiment indétectable pendant le développement. Cela conduit à une forte perturbation du développement neuronal et s'accompagne d'une épilepsie sévère. Les niveaux de D-sérine peuvent être restaurés par l'administration de L-sérine (Fuchs et al., 2006).

2.5 Implication de la D-sérine dans l'asphyxie périnatale

L'asphyxie périnatale se produit chez les nouveaux nés, elle est définie par une hypoxie ou une ischémie cérébrale. L'hypoxie est caractérisée par un apport trop faible en oxygène par rapport au besoin du tissu tandis que l'ischémie cérébrale est le résultat d'une réduction transitoire ou permanente du flux sanguin cérébral due à l'occlusion ou au rétrécissement d'une artère cérébrale (Dirnagl et al., 1999). L'excitotoxicité joue un rôle prédominant dans la perte neuronale due à l'hypoxie-ischémie présente dans cette pathologie (Choi and Rothman, 1990). L'application de DAAO sur des tranches cérébrocorticales de rat diminue la perte neuronale induite par la privation en oxygène et glucose, protocole utilisé pour induire de l'ischémie (Katsuki et al., 2004). Selon le même protocole, la même équipe montre que les concentrations extracellulaires de glutamate, D-sérine et glycine sont augmentées significativement (Katsuki et al., 2007). Kirschner et al. (2009b) confirment ce résultat et ajoutent que la concentration de D-sérine est multipliée par 2,5. Des souris KO pour la sérine racémase ($SR^{-/-}$) sont protégées contre l'ischémie cérébrale induite par une occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Une diminution de la formation d'oxyde nitrique (NO) et de la neurotoxicité est également observée (Mustafa et al., 2010). Fuchs et al. (2012) observent une augmentation de la D-sérine et de la glycine sur culture de cellules de gliomes de rat soumises à une privation en oxygène et en glucose. Ils mesurent également *in vivo* cette augmentation de D-sérine et de glycine, dans le liquide cébrospinal de porcelet soumis à une ischémie et

une hypoxie. L'augmentation de D-sérine est plus modérée que celle de la glycine et la concentration de D-sérine diminue fortement pendant la phase de reperfusion contrairement à celle de la glycine qui reste élevée *in vitro* et *in vivo* (Fuchs et al., 2012).

3. Implication de la D-sérine dans la schizophrénie

La D-sérine n'est pas seulement impliquée dans des pathologies neurodégénératives mais également dans une maladie psychiatrique, la schizophrénie.

3.1 Description

La schizophrénie est une maladie psychiatrique chronique. Elle touche 1% de la population mondiale. Elle se caractérise cliniquement par des symptômes divisés en trois classes : les symptômes positifs tels que les hallucinations ou psychoses, les symptômes négatifs tels qu'une perte de motivation, un retrait social sévère, un déclin affectif et une apathie et les symptômes cognitifs tels que les déficits d'apprentissage et de mémorisation (Balu and Coyle, 2011). Pendant de nombreuses années, la dopamine a été considérée comme la cause de la schizophrénie. Les traitements basés sur cette voie de signalisation n'améliorent pas tous les symptômes en particulier les symptômes négatifs et cognitifs de la maladie. Cela laisse penser que d'autres neurotransmetteurs sont probablement impliqués. Des études plus récentes se sont intéressées au rôle du glutamate. Une hypofonction des récepteurs NMDA a été proposée. L'administration de kétamine, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, chez des humains engendre des symptômes similaires à ceux de la schizophrénie (Krystal et al., 1994). L'administration de phencyclidine (PCP), un antagoniste des récepteurs NMDA développé comme anesthésique à la fin des années 1950, provoque des hallucinations chez des patients sains et accentue les symptômes chez des patients schizophrènes (Javitt and Zukin, 1991). Son administration chez des rongeurs ou des primates provoque également des symptômes semblables à ceux de la schizophrénie (Egerton et al., 2008). Une diminution des ARNm de la sous unité NR1 dans le thalamus, l'hippocampe et le cortex est mesurée dans des tissus postmortem de patients schizophrènes (Meador-Woodruff et al., 2003, Millan, 2005). Des souris transgéniques avec une activité des récepteurs NMDA réduite due à une hypofonction de la sous unité NR1 présentent également les symptômes négatifs et cognitifs de la schizophrénie (Labrie et al., 2008, Halene et al., 2009). Ces résultats suggèrent une implication de la glycine ou de la D-sérine. Les hypothèses penchent pour une implication de la D-sérine contrairement à la glycine due à son implication dans les fonctions cognitives (Panatier et al., 2006, Fossat et al., 2012).

3.2 Des mesures de la concentration de D-sérine contradictoires

De nombreuses études ont examiné le niveau de D-sérine et des enzymes associées chez des patients atteints de schizophrénie. Concernant le niveau de D-sérine, ces études donnent des résultats contradictoires. Des mesures dans le liquide cébrospinal indiquent une diminution de la D-sérine chez les patients schizophrènes traités avec des antipsychotiques contrairement aux contrôles (Bendikov et al., 2007). En revanche, une autre étude ne mesure aucune différence dans les niveaux de D-sérine présente dans le liquide cébrospinal des patients venant de déclarer la maladie et sans traitements ainsi que chez des patients schizophrènes chroniques traités par olanzapine pendant 6 semaines contrairement aux sujets contrôles (Hashimoto et al., 2005). D'autres études sur les niveaux plasmatiques de D-sérine trouvent soit un niveau de D-sérine élevé chez des patients sans traitement (Baruah et al., 1991) ou dans un groupe de patients avec ou sans traitement (Ohnuma et al., 2008), soit un niveau de D-sérine plus faible chez des patients avec un traitement antipsychotique comparé à des patients contrôles (Hashimoto et al., 2003). Une étude récente montre une diminution du niveau plasmatique de D-sérine chez des patients avec différents traitements (halopéridone, clozapine, chlorpromazine, trifluoperazine, fluphenazine, quetiapine) ou sans traitement (Calcia et al., 2012a). Ces différences peuvent s'expliquer de deux façons. Premièrement, les mesures sont faites sur des patients n'ayant pas la même sévérité de la maladie. Deuxièmement, selon les études les patients n'ont soit pas le même traitement médicamenteux, soit pas de traitement du tout.

3.3 Implication de la sérine racémase

Les données concernant des modifications de l'expression de la sérine racémase sont assez controversées. Une réduction protéique de la sérine racémase a été observée dans l'hippocampe et dans le cortex frontal du cerveau de patients schizophrènes lors d'études postmortem (Bendikov et al., 2007). Cependant, d'autres études ont observé le résultat inverse, une augmentation de l'expression de la sérine racémase dans l'hippocampe et dans le cortex préfrontal (Steffek et al., 2006, Verrall et al., 2007). Des souris, mutées pour le gène de la sérine racémase et présentant une diminution de la concentration de D-sérine cérébrale, montrent des déficits cognitifs caractéristiques de la schizophrénie (Labrie et al., 2009). Chez ces souris, parallèlement à la diminution de la sérine racémase, une augmentation de PICK1 est observée. PICK1 peut se lier à la sérine racémase mais également à d'autres protéines impliquées dans la schizophrénie comme les transporteurs de la dopamine, les récepteurs de la neureguline et aux éphrines. De plus, des niveaux anormaux du transcrit de PICK1 ont été retrouvés dans le cortex préfrontal de patients schizophrènes (Beneyto and Meador-Woodruff, 2006). Ainsi, l'implication de la sérine racémase pourrait être indirecte et liée à une augmentation de PICK1 à l'origine de l'activation de protéines reconnues comme ayant un rôle dans la schizophrénie.

Le rôle du gène SRR dans la schizophrénie, gène de la serine racémase, est également étudié. Des variations anormales dans la région 5' du promoteur peuvent conférer un risque élevé pour la schizophrénie (Goltsov et al., 2006, Morita et al., 2007, Labrie et al., 2009).

3.4 Implication de la D-Amino acide oxydase

Contrairement aux données concernant la D-sérine et la sérine racémase, celles concernant la DAAO sont cohérentes. Des études ont démontré que l'enzyme de dégradation de la D-sérine a son activité augmentée dans le cortex (Madeira et al., 2008) et le cervelet (Burnet et al., 2008). En conditions physiologiques, aucune activité de la DAAO n'a été trouvée dans le cortex (Wang and Zhu, 2003) tandis que des marquages immunohistochimiques la localise dans cette zone (Verrall et al., 2007). On peut émettre l'hypothèse que l'activité de la DAAO en conditions pathologiques est présente dans des zones où elle était présente mais inactive en conditions physiologiques. Plusieurs études postmortem ont également montré que la DAAO a son expression augmentée dans le cervelet, l'hippocampe et le plexus choroïde (Bendikov et al., 2007, Verrall et al., 2007, Habl et al., 2009). Des souris transgéniques pour le gène *Dao1* présentent une perte complète de la fonction de la DAAO et une augmentation de la D-sérine cérébrale. Des souris mutantes pour *Grin1*, allèle codant pour la sous unité NR1 des récepteurs NMDA, ont un comportement anormal associé à des symptômes négatifs et cognitifs de la schizophrénie. Pour évaluer la fonction de la DAAO dans la schizophrénie, des souris mutantes pour *Dao1* sont combinées avec des souris avec la mutation *Grin1*. L'inactivation de la DAAO permet d'inverser l'hypofonction des récepteurs NMDA observé chez les souris mutantes pour *Grin1* seul (Labrie et al., 2010).

Le gène de la DAAO est localisé sur la région chromosomique 12q23, région liée à la schizophrénie (Sklar, 2002). Ces résultats impliquent la DAAO dans la schizophrénie.

3.5 Implication de la protéine pLG72

Actuellement, il est envisagé que la schizophrénie possède une forte composante génétique. Chumakov et al. (2002) ont été les premiers à montrer une association entre le gène *G72* et la schizophrénie. Le gène *G72* est uniquement présent chez les primates. Ce gène a été découvert en étudiant la région chromosomique 13q34, région associée à la schizophrénie (Shaw et al., 1998). Une transcription *in vitro* de ce gène montre qu'il produit un polypeptide de 153 acides aminés. Des souris transgéniques exprimant le gène *G72* humain ont été générées dans le but d'étudier les modifications comportementales induites par ce gène. Ces souris présentent un déficit sensorimoteur pouvant être réversé par l'administration d'halopéridol, une anti psychotique utilisée dans le traitement de la schizophrénie. Cette étude supporte l'implication de ce gène dans la schizophrénie (Otte et al., 2009).

Chumakov et al. (2002) démontrent que la protéine pLG72 est capable d'interagir avec la DAAO par une interaction protéine-protéine. Ce gène est montré comme un activateur de la

DAAO. Lorsque la protéine dérivant de ce gène est mise en présence de la DAAO, l'activité de cette enzyme est multipliée par trois en condition normale. Ainsi l'équipe de Chumakov propose un modèle où la surexpression du gène G72 dans la schizophrénie produit une augmentation de l'activité de la DAAO, une diminution de la concentration de la D-sérine et ainsi, à une hypofonction des récepteurs NMDA (Chumakov et al., 2002, Scolari and Acosta, 2007). Cependant, plus récemment, une fonction de régulateur négatif de l'activité de la DAAO a aussi été attribuée à pLG72 (Sacchi et al., 2008). La protéine pLG72 en condition normale se lie à la DAAO active pour former un complexe qui va inactiver l'enzyme. D'après ces auteurs, la protéine pLG72 est sous exprimée chez les schizophrènes et l'inactivation de la DAAO par le complexe DAAO-G72 est diminuée. Ces deux mécanismes, bien qu'opposés, aboutissent tous deux à une diminution de la concentration de D-sérine et à une hypofonction des récepteurs NMDA (Figure 13). Une différence majeure entre ces deux hypothèses est la source de la DAAO étudiée. L'étude de Chumakov et al. (2002) a été réalisée à partir de DAAO de rein de porc tandis que celle de Sacchi et al. (2008) a été réalisée à partir de DAAO recombinante humaine. L'équipe de L. Pollegioni et S. Sacchi a comparé la DAAO de rat et la DAAO humaine. Elle a démontré qu'elles sont différentes selon plusieurs critères. Un des critères est que la DAAO de rat peut interagir avec pLG72 pour former 2 complexes, un de 100 kDa et un de 200 kDa. En revanche, la DAAO humaine ne peut former qu'un seul complexe de 200 kDa (Frattini et al., 2011). Ces résultats pourraient expliquer les différentes hypothèses émises quant à la fonction du complexe G72-DAAO.

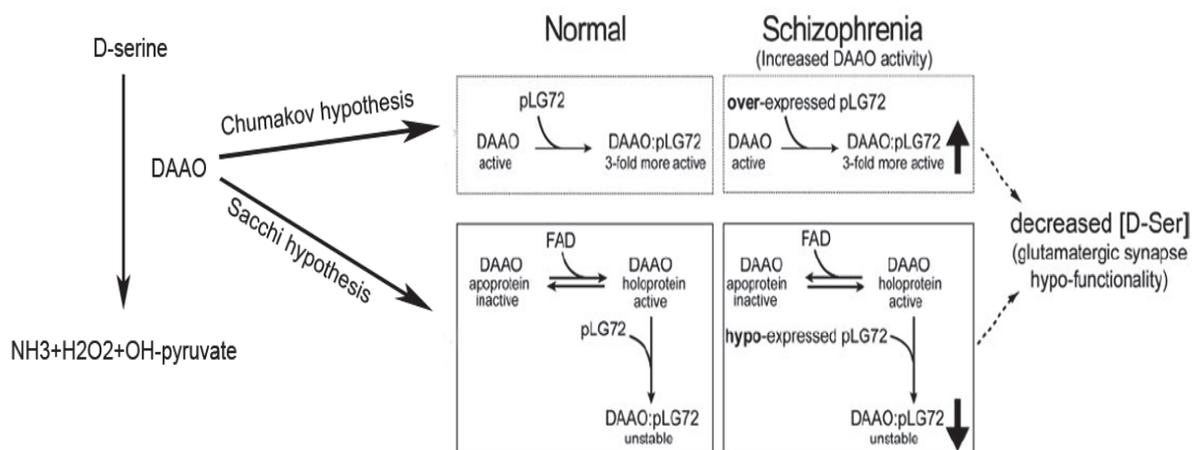


Figure 13 : Hypothèses du rôle de la DAAO et pLG72 sur la disponibilité de la D-sérine lors de conditions normales ou pathologiques.

L'hypothèse supérieure, celle de Chumakov (Chumakov et al., 2002), indique que dans la schizophrénie, il y a une surexpression du gène pLG72, cela conduit à une suractivation de la DAAO. L'hypothèse inférieure, celle de Sacchi (Sacchi et al., 2008), indique que dans la schizophrénie il y a une sous-expression du gène pLG72 et qu'il en résulte une augmentation de la DAAO. Les deux hypothèses aboutissent à une diminution de la concentration de D-sérine. D'après Sacchi et al. (2008).

D'autres études, cependant, n'ont pas détecté la pLG72 dans le cerveau humain (Benzel et al., 2008). L'équipe de Maycox propose que la protéine pLG72 existe bien mais qu'elle est exprimée à des niveaux très faibles et que par conséquent, elle ne peut pas jouer de rôle dans la modulation de l'activité de la DAAO en condition normale et dans la schizophrénie. L'étude de Kvajjo et al. (2008) vient renforcer ces conclusions, la pLG72 est bien détectée mais une interaction fonctionnelle entre cette protéine et la DAAO n'est pas confirmée. L'ensemble de ces données montre que des études supplémentaires sont nécessaires pour éclaircir le rôle de pLG72 dans la schizophrénie.

3.6 Traitements

La D-sérine ainsi que les autres substances pouvant se lier au niveau du site de fixation de la D-sérine/glycine sont étudiées pour développer de futurs traitements capables d'augmenter l'activation des récepteurs NMDA chez les schizophrènes. Chez les rongeurs, il a été montré que la D-sérine traverse bien la barrière hémato encéphalique après une injection systémique contrairement à la glycine (Oldendorf, 1971) et qu'elle persiste dans le cortex après l'injection (Oldendorf, 1971, Hashimoto and Chiba, 2004). Plusieurs essais cliniques ont évalué l'utilisation de D-sérine en complément des traitements antipsychotiques. La première étude de Tsai et al. (1998) est une étude en double aveugle avec des patients schizophrènes recevant soit un placebo en plus de leur traitement antipsychotique, soit de la D-sérine (30 mg/kg/jour) pendant 6 semaines. Cette étude montre que les patients recevant de la D-sérine ont une amélioration significative de leurs symptômes positifs, négatifs et cognitifs. Une autre étude chez des patients traités avec de l'olanzapine ou de la rispéridone montre également une amélioration significative de l'ensemble des symptômes de la schizophrénie après administration de 30 mg/kg de D-sérine pendant 6 semaines (Heresco-Levy et al., 2005). En revanche, une autre étude en double aveugle de Tsai et al. (1999) montre que chez des patients ayant comme traitement antipsychotique de la clozapine, l'administration de D-sérine (30 mg/kg) n'améliore pas les symptômes ni ne les amplifie. La dose optimale de D-sérine à utiliser en clinique n'a pas encore été déterminée. L'administration de 2 g de D-sérine quotidiennement, n'a pas donné d'amélioration par rapport au placebo, chez des patients traités à la rispéridone (Lane et al., 2005), olanzapine ou quetiapine (Lane et al., 2010). Une dernière étude récente de Weiser et al. (2012) ne montre pas d'amélioration des symptômes de la schizophrénie après 16 semaines de traitement avec une administration de 2 g de D-sérine. Concernant la dose optimale de D-sérine pouvant être administrée, Kantrowitz et al. (2010) ont testé 3 doses de D-sérine différentes (30, 60 et 120 mg/kg) pendant 4 semaines. Ils ont montré que toutes les doses améliorent les symptômes significativement. En revanche de meilleurs résultats sont observés pour les doses supérieures à 60 mg/kg (Tableau 4).

On peut noter que dans ces études, seules celles utilisant des doses de D-sérine allant de 30 mg/kg jusqu'à 120 mg/kg montrent une amélioration significative des symptômes négatifs, positifs et cognitifs. On peut s'interroger si l'administration de 2g de D-sérine n'est pas une dose trop faible selon les patients et qu'il est important d'adapter la dose au poids du patient. La toxicité de la D-sérine selon la dose administrée est également à prendre en compte car une

étude chez le rat montre qu'à partir de 75 mg/100g la D-sérine peut être toxique pour les reins (Carone and Ganote, 1975, Carone et al., 1985). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour définir la dose optimale de D-sérine à administrer. Il est également nécessaire de définir en complément de quel traitement antipsychotique la D-sérine peut être administrée car certaines études font l'hypothèse que la clozapine par exemple empêche d'avoir les bénéfices de l'ajout de D-sérine (Singh and Singh, 2011).

Study (year)	Study design	Daily dosage	Subjects (n)	Study duration	Patient sample	Drug treatment	Positive results
Tsai et al. (1998)	Double blind, placebo controlled	30 mg/kg	28	6 weeks	Refractory	Typical/atypical/ drug naive	Statistically significant
Tsai et al. (1999)	Double blind, placebo controlled	30 mg/kg	20	6 weeks	Refractory	Clozapine	No
Lane et al. (2005)	Double blind, placebo controlled	2 g	57	6 weeks	Acute	Risperidone	Nonsignificant trend
Heresco-Levy et al. (2005)	Double blind, placebo controlled	30 mg/kg	38	6 weeks	Refractory	Risperidone/ olanzapine	Statistically significant
Lane et al. (2010)	Double blind, placebo controlled	2 g	51	6 weeks	Chronic	Risperidone/ quetiapine/ olanzapine	Nonsignificant trend
Kantrowitz et al. (2010)	Open label	30–60–120 mg/kg	34	4 weeks	Chronic	Typical/atypical	Statistically significant
Weiser et al. (2012)	Double blind placebo controlled	2 g	195	16 weeks	Chronic	Typical	Nonsignificant

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des différentes études cliniques utilisant de la D-sérine pour traiter la schizophrénie (D'après Nunes et al. (2012)).

Des inhibiteurs de la DAAO sont également envisagés comme traitement pour augmenter la concentration de D-sérine. Un inhibiteur spécifique de la DAAO a été développé et testé par les laboratoires Merck : le AS057278 (5-Methylpyrazole-3-carboxylic acid). Chez un modèle murin de schizophrénie par injection de PCP, l'administration de AS057278 par un traitement oral chronique permet de normaliser l'hyperlocomotion induite par le PCP (Adage et al., 2008). Une seconde étude de ce laboratoire sur un inhibiteur de la DAAO, le composé 8 [4Hthieno[3,2-b]pyrrole-5-carboxylic acid], démontre que l'inhibition de la DAAO augmente significativement la concentration de la D-sérine en périphérie et dans le système nerveux central. Cependant, cette inhibition n'est pas suffisante pour augmenter la concentration de D-sérine et obtenir des effets antipsychotiques et cognitifs similaires à ceux obtenus par l'administration exogène de D-sérine (Smith et al., 2009). Une autre molécule a également été testée pour inhiber la DAAO : le CBIO (5-chloro-benzo[d]isoxazol-3-ol). Le CBIO utilisé seul augmente faiblement la D-sérine présente dans le cerveau par comparaison avec une administration de D-sérine. En revanche, la coadministration de CBIO et de D-sérine augmente la quantité de D-sérine plasmatique (Ferraris et al., 2008) et cérébrale chez des rats (Hashimoto et al., 2009) par comparaison avec une administration de D-sérine seule. Ces

études suggèrent une coadministration des inhibiteurs de DAAO et de D-sérine pour améliorer les symptômes positifs, négatifs et cognitifs de la schizophrénie. Cela permettrait de diminuer les doses de D-sérine administrées et ainsi de s'affranchir des effets toxiques dus à l'utilisation de fortes doses de D-sérine.

Récemment, l'équipe de L. Pollegioni a montré que la DAAO de rat est différente de la DAAO humaine selon plusieurs critères : a) elle possède une spécificité de substrat différente. Elle a une plus forte affinité pour les composés hydrophobes comme le D-tryptophane et la D-phénylalanine. b) elle possède une activité plus faible pour la D-sérine et la D-alanine principalement due à une faible affinité pour son substrat. c) la DAAO de rat ne possède pas la même affinité pour les inhibiteurs que la DAAO humaine. d) la DAAO de rat est un monomère stable. e) la DAAO de rat peut interagir avec pLG72 pour former 2 complexes, un de 100 kDa et un de 200 kDa. En revanche, la DAAO humaine ne peut former qu'un seul complexe de 200 kDa (Frattini et al., 2011). Ces résultats soulignent les limites de l'utilisation de rats comme modèle pour tester les inhibiteurs de la DAAO dans le but de trouver un traitement contre la schizophrénie.

E. Hypothèses de travail et objectifs

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au rôle de la D-sérine dans le fonctionnement sain et pathologique du système nerveux central et, en particulier, à ses fonctions excitotoxiques dans les agressions cérébrales et les maladies neurodégénératives. Notre laboratoire a mis au point des biocapteurs enzymatiques spécifiques pour la détection de la D-sérine (Pernot et al., 2008) et du glutamate dans le système nerveux central chez l'animal anesthésié ou vigile. Ceux-ci ont l'avantage d'être de taille très réduite (100 µm de long par 40 µm de diamètre), ne lésant pas la barrière hématoencéphalique et d'avoir un enregistrement seconde par seconde. Les biocapteurs spécifiques du glutamate ont été mis au point récemment grâce à une nouvelle méthode d'immobilisation d'enzyme sur des microélectrodes (Vasylieva et al., 2011). Cette méthode permet de détecter le glutamate avec une haute spécificité et offre de nouvelles possibilités pour la compréhension des mécanismes excitotoxiques *in vivo*.

Pendant ma thèse, j'ai mis au point au laboratoire un modèle de *status epilepticus*, sur la base d'un protocole établi par l'équipe de Laurent Bezin (Sanchez et al., 2009) au Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon dont les recherches sur la pathophysiologie et l'amélioration de la neuroprotection dans l'épilepsie et les traumatismes crâniens sont complémentaires aux nôtres. Notre but était de développer un modèle d'agression cérébrale avec une composante excitotoxique solidement établie. Nous avons choisi ce modèle car l'implication de la D-sérine est plus simple à étudier que dans d'autres pathologies multifactorielles comme le traumatisme crânien ou médullaire. Dans ce modèle, des structures cérébrales comme l'amygdale, le cortex piriforme ou le thalamus sont sévèrement lésées après 2 h de *status epilepticus* et les lésions peuvent être diminuées par des antagonistes NMDA, ce qui suggère l'existence de processus excitotoxiques (Brandt et al., 2003, Fujikawa, 2005).

En collaboration avec le service de neuroréanimation des Hospices Civils de Lyon, notre laboratoire travaille également sur l'implication de la D-sérine, du glutamate et des processus excitotoxiques dans les traumatismes crâniens ou les vasospasmes cérébraux après hémorragies cérébrales. Grâce à nos biocapteurs enzymatiques, nous sommes un des seuls laboratoires à pouvoir étudier la D-sérine dans ces différents contextes *in vivo* et en temps réel.

Depuis la découverte de la D-sérine dans le système nerveux central par Hashimoto et al. (1992a), de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à sa régulation, à ses implications physiologiques ou pathologiques. Bien que les connaissances concernant la D-sérine ont considérablement augmenté, il reste encore des questions non résolues. Il est important de bien connaître ses mécanismes de régulation pour mettre au point des traitements pharmacologiques adaptés. Pour envisager de moduler les niveaux de D-sérine, par des inhibiteurs de la DAAO ou par administration orale de D-sérine par exemple, il faut tout d'abord connaître précisément ses mécanismes de dégradation et de recapture *in vivo*.

Ma thèse est constituée de deux axes principaux. Premièrement, je me suis intéressée aux mécanismes de régulation de la D-sérine dans l'espace extracellulaire. Il nous a semblé important de savoir quelle est la diffusion de la D-sérine à travers la barrière hématoencéphalique ? Quelle est la concentration de la D-sérine dans l'espace extracellulaire, le sang et le tissu cérébral et la quantité de D-sérine stockée dans les compartiments intracellulaires ? Les mécanismes contrôlant la concentration extracellulaire de D-sérine sont encore largement inconnus *in vivo*. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la recapture et à la libération de la D-sérine extracellulaire et à l'implication des transporteurs ASC. Concernant sa dégradation, il a été démontré que la D-sérine est dégradée par la D-amino acide oxydase. D'après les données *in vitro*, la sérine racémase peut également la dégrader. Quels sont les rôles respectifs joués par la DAAO et la sérine racémase dans la dégradation de la D-sérine *in vivo* ? Comprendre la régulation de la D-sérine de par son stockage, sa recapture, sa dégradation est essentielle pour améliorer notre compréhension des pathologies où elle est impliquée et adapter les traitements comme par exemple les prises orales de D-sérine.

Deuxièmement, j'ai étudié l'implication potentielle de la D-sérine dans l'excitotoxicité. Le glutamate est considéré comme le neurotransmetteur responsable de l'excitotoxicité. Bien que le rôle de la D-sérine dans l'excitotoxicité commence à être de plus en plus envisagé, quelle est son implication dans cette mort neuronale *in vivo* ? Une augmentation de la concentration de glutamate seule est-elle suffisante ou un changement de la concentration de D-sérine est-elle également mise en jeu ? Tout d'abord, nous avons voulu pouvoir quantifier précisément et simplement la densité neuronale. Pour cela, nous avons développé une méthode de comptage simple et automatique. Nous avons validé cette méthode de comptage sur un modèle de *status epilepticus* chez le rat. Après avoir identifié une composante excitotoxique et déterminé les zones les plus touchées par l'excitotoxicité, notre objectif a été d'enregistrer les concentrations extracellulaires de D-sérine et de glutamate pendant et après un *status epilepticus* chez des rats vigils dans ces zones pour voir l'implication de ces deux transmetteurs en temps réel *in vivo*.

En résumé, mes objectifs pendant mon travail de thèse ont été, tout d'abord en ce qui concerne les mécanismes de régulation de la D-sérine :

- 1) d'étudier la diffusion de la D-sérine à travers la barrière hématoencéphalique et d'estimer sa concentration dans différents compartiments,
- 2) de déterminer les mécanismes de recapture et de libération de la D-sérine extracellulaire *in vivo*,
- 3) d'étudier le rôle de la DAAO et de la sérine racémase dans la dégradation de la D-sérine *in vivo*.

Puis concernant l'implication de la D-sérine dans l'excitotoxicité,

- 4) de mettre au point une méthode de quantification de la densité neuronale et de l'appliquer à un modèle de *status epilepticus* chez le rat,
- 5) de déterminer le rôle de la D-sérine et du glutamate dans la mort neuronale par excitotoxicité dans un modèle de *status epilepticus* chez le rat vigile.

II. Techniques

Cette partie présente les deux principales techniques utilisées pendant mon travail de thèse. Elle comporte tout d'abord une description des biocapteurs enzymatiques développés dans notre laboratoire. Ensuite, une présentation de la technique d'immunofluorescence et de sa détection par microscopie confocale.

A. Les biocapteurs enzymatiques

La technique analytique de référence utilisée *in vivo* pour mesurer la concentration des neurotransmetteurs est la microdialyse. Elle consiste à implanter dans le cerveau une sonde équipée d'une membrane de dialyse et perfusée par un milieu extracellulaire artificiel. Ce milieu est ensuite récupéré en sortie de sonde et sa composition est analysée par des techniques de chimie analytique comme la chromatographie en phase liquide ou l'électrophorèse capillaire. Un de ses avantages est la possibilité de mesurer la concentration de plusieurs molécules à la fois. Cependant, un de ses désavantages est la taille de la sonde pour une utilisation dans le cerveau *in vivo*. Les sondes ont en général un diamètre compris entre 200 et 250 μm et une longueur entre 500 et 3000 μm . L'implantation *in vivo* de ces sondes provoque des lésions et peut conduire à des œdèmes, des changements dans la microcirculation et à une gliose réactionnelle (Benveniste and Diemer, 1987, Khan and Michael, 2003, Borland et al., 2005). Il est également possible que suite à l'implantation, la sonde soit entourée par une couche de tissu lésé gênant la diffusion et la détection physiologique des molécules (Borland et al., 2005). Dans le but de minimiser ces lésions, notre laboratoire a mis au point des microbiocapteurs enzymatiques de taille très réduite (100 μm de long par 40 μm de diamètre) qui ne lèsent pas la barrière hématoencéphalique. Ils ont également une meilleure résolution spatiale et temporelle comparée à la microdialyse (Pernot et al., 2008).

1. Principe général d'un biocapteur

Un biocapteur est un système permettant de transformer un phénomène biologique ou une propriété biochimique d'un système en un signal électrique. Un biocapteur est composé d'un biorécepteur, qui peut être une enzyme ou un anticorps et permet la détection de l'élément biologique. Ce biorécepteur est couplé à un transducteur qui va traduire la détection de l'élément biologique en un signal physique mesurable et quantifiable (Figure 1). Le premier biocapteur a été mis au point par Leland Clark dans les années 1960 et permis de détecter le glucose.

2. Les biocapteurs enzymatiques

Au laboratoire, des biocapteurs enzymatiques ont été développés dans le but de mesurer la concentration extracellulaire de diverses molécules chimiques. Le principe de détection est commun aux différents biocapteurs. Nos biocapteurs enzymatiques sont composés d'un fil de platine (90% Pt/10% Ir) de 25 μm de diamètre. Ce dernier est inséré dans un capillaire en verre étiré, seule la pointe d'une taille de 100 μm va dépasser. La pointe du fil de platine est recouverte d'une couche d'une membrane sélective, la poly-m-phénylenediamine, déposée par électropolymérisation. Cette membrane établit un filtre stérique ne laissant diffuser que les molécules de faible poids moléculaire comme le peroxyde

d'hydrogène (H_2O_2) et empêche les molécules oxydables endogènes plus volumineuses telles que la sérotonine ou l'acide ascorbique de s'oxyder au contact de l'électrode. Ensuite, une couche d'enzyme est déposée manuellement et immobilisée par réticulation avec du poly (éthylène glycol) diglycidyl ether (Vasylieva et al., 2011).

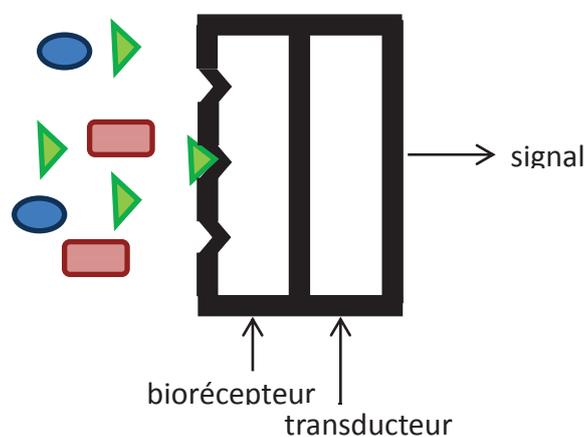


Figure 1 : Schéma d'un biocapteur

La molécule biologique vient se fixer spécifiquement sur le biorécepteur. Le transducteur va ensuite traduire cette détection en un signal électrique.

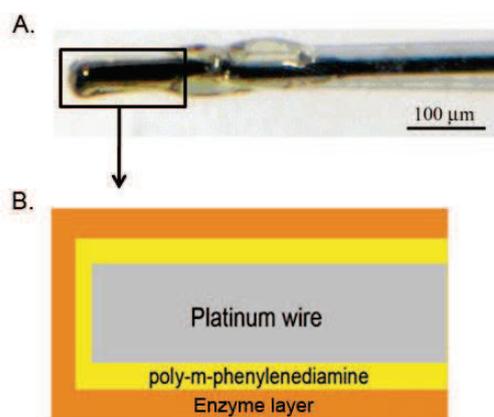


Figure 2 : Principe général d'un biocapteur enzymatique.

A. Photographie d'un biocapteur

B. Représentation schématique de la pointe d'un biocapteur. Le fil de platine au centre, d'une longueur de $100\mu m$, est recouvert par une couche de poly-m-phenylenediamine. L'ensemble est recouvert d'une couche d'enzyme.

Ces biocapteurs ont la particularité d'être petits. Leur partie sensible a un diamètre de $40\mu m$ et une longueur de $100\mu m$, ce qui leur permet de préserver l'intégrité de la barrière hématoencéphalique et du système nerveux lors de leur insertion. Nous possédons au laboratoire des biocapteurs à D-sérine, à glutamate, à lactate et à glucose. Le principe est le même pour chaque biocapteur, il suffit de changer l'enzyme pour détecter spécifiquement une

autre molécule. La majorité des expériences de ce travail de thèse ont utilisé ces biocapteurs enzymatiques pour enregistrer les concentrations extracellulaires de D-serine et de glutamate.

2.1 Biocapteurs à D-sérine

Le biocapteur à D-sérine a été mis au point par Pernot et al. (2008). Il est recouvert d'une enzyme spécifique de la D-sérine, la D-amino acide oxydase de *Rhodotorula gracilis* (Pollegioni et al., 1997, Pollegioni et al., 2008). La DAAO dégrade la D-sérine en hydroxypyruvate. Il y a en même temps production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui va être oxydé au contact du fil de platine et produire un courant électrique (figure 3). Lorsque le biocapteur détecte de la D-sérine, il y a génération d'un saut de courant proportionnel à sa concentration. Ce biocapteur détecte la D-sérine avec un temps de réponse de 3.7 ± 0.9 secondes (Vasylieva et al., 2011).

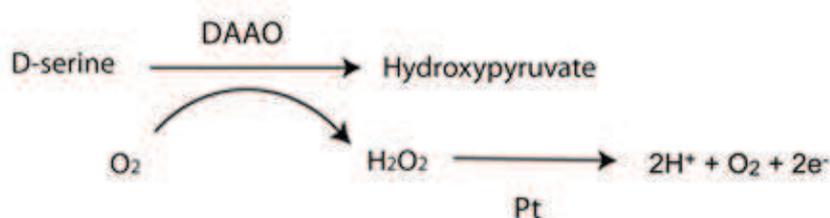


Figure 3 : Réaction enzymatique permettant la détection de la D-sérine

2.2 Biocapteurs à glutamate

Ce biocapteur est recouvert de l'enzyme de dégradation du glutamate, la glutamate oxydase. Elle oxyde le glutamate en α -cétoglutarate + NH_3 . Comme précédemment, il y a production d' H_2O_2 et ainsi formation d'un courant électrique (figure 4). Le temps de réponse du capteur glutamate est de 3.6 ± 0.5 s (Vasylieva et al., 2011).

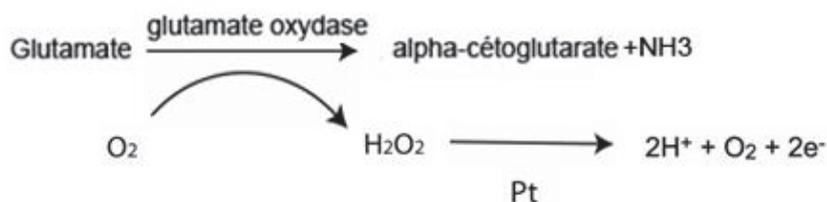


Figure 4 : Réaction enzymatique permettant la détection du glutamate

2.3 Biocapteurs contrôlés

Les biocapteurs contrôlés sont recouverts d'une couche d'albumine de sérum bovin (BSA). Ils détectent exactement les mêmes courants non spécifiques dus au transfert d'électrons entre le milieu extracellulaire et l'électrode, ou à l'oxydation de l' H_2O_2 endogène présent dans le SNC. En revanche, ils ne détectent pas le courant produit par l'oxydation spécifique de la D-sérine ou du glutamate par exemple.

3. Acquisition

Les enregistrements ampérométriques sont réalisés à l'aide d'un amplificateur électrochimique VA-10 (NPI électronique) connecté à deux têtes d'amplification (500 M Ω de résistance) reliées à une carte d'acquisition ITC-18 (Instrutech), le tout commandé par le logiciel Igor Pro 6.0 (Instrutech). Les enregistrements ampérométriques sont effectués à un potentiel constant de +500mV par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl.

4. Calibration des biocapteurs enzymatiques

Avant et après chaque expérience *in vitro* ou *in vivo*, les biocapteurs sont calibrés pour la D-sérine ou le glutamate et la sérotonine (un exemple de molécule endogène oxydable) dans une solution de tampon phosphate (PBS, 0,01M, pH 7,4). Si la sensibilité du biocapteur diminue de plus de 25% entre le début et la fin de l'enregistrement ou que la couche de PPD perd de son efficacité (le biocapteur détecte plus de 1pA/10 μ M de sérotonine), l'expérience est alors rejetée, ce qui représente 5 à 10 % des expériences.

B. Principe de l'immunofluorescence et de sa détection

1. Importance de la technique de marquage utilisée pour quantifier la mort neuronale

Un de mes objectifs est de déterminer une méthode de comptage pour quantifier précisément la mort neuronale par excitotoxicité. Le choix du marqueur est primordial. Il existe plusieurs types de marquages spécifiques de la mort neuronale comme notamment le Fluoro-jade C (FJC), utilisé pour mettre en évidence les neurones en dégénérescence (Rossetti et al., 2012) ou le marquage tunel (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) permettant de détecter l'ADN fragmenté, résultat d'une réaction apoptotique, par marquage des extrémités des acides nucléiques (Lai et al., 2009). Le fluorojade marque les neurones en souffrance à un instant précis mais cela ne signifie pas que ces neurones évolueront tous vers la mort cellulaire. Le marquage TUNEL, quant à lui, est spécifique des

processus apoptotiques et ne marque que faiblement les neurones nécrotiques (Loo, 2011). Or, l'excitotoxicité médiée par le glutamate et peut être, la D-sérine, induit aussi bien une mort cellulaire de type apoptotique que nécrotique. Pour nous affranchir des biais méthodologiques liés au choix d'un biomarqueur de la mort neuronale, nous avons choisi de compter le nombre de neurones marqués et de déterminer leur densité sur des coupes de cerveau fixé. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un marqueur spécifique des neurones, NeuN. Il est à la fois nucléaire et cytoplasmique (Schauwecker, 2010). Pour détecter NeuN, nous avons choisi une technique courante d'immunofluorescence ou NeuN est détecté par un anticorps secondaire couplé lui-même à un fluorochrome.

2. Principe de l'immunofluorescence

L'immunofluorescence consiste à marquer un antigène dans un tissu ou une cellule par un anticorps primaire spécifique. Ce dernier est marqué par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui sera détecté par un microscope à fluorescence. Plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur un anticorps primaire ce qui permet une amplification du signal de détection (Figure 5).

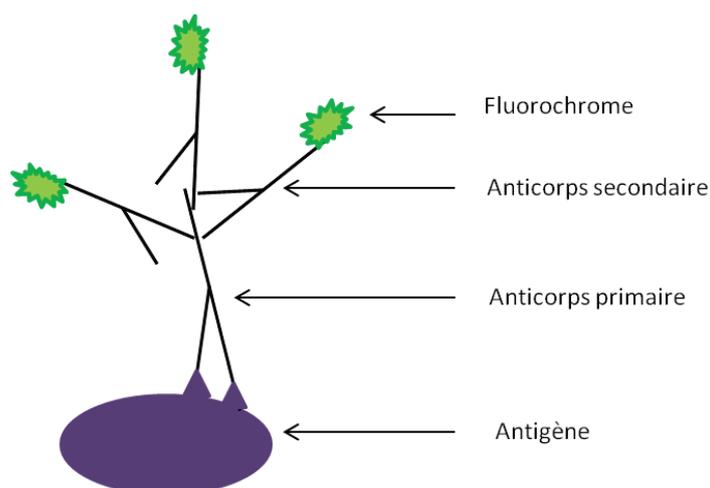


Figure 5 : Schéma du principe de l'immunofluorescence

L'anticorps primaire se fixe spécifiquement sur l'antigène. L'anticorps secondaire, spécifique de l'anticorps primaire, se fixe sur ce dernier. Il est couplé à un fluorochrome. Ce système va permettre la détection d'un antigène donné.

2.1 Les fluorochromes

Les fluorochromes sont caractérisés par leur longueur d'onde d'excitation et d'émission qui leur sont propres. Ils absorbent la lumière à une longueur d'onde donnée et

émettent de la lumière à une longueur d'onde plus élevée. Plusieurs critères sont importants pour définir un fluorochrome. Le premier est le déplacement de Stokes, c'est la distance entre les maxima d'excitation et d'émission. Plus cette distance est grande, plus il est facile de discriminer la lumière d'excitation utilisée de la lumière émise par le fluorochrome. Le second est la durée de vie de la fluorescence. Elle correspond à la durée pendant laquelle un fluorochrome demeure dans un état excité. La majorité des fluorochromes ont une durée de vie de l'ordre de la nanoseconde. Un temps court permet plusieurs excitations successives car le fluorochrome repasse rapidement dans son état fondamental. Le troisième critère est le rendement quantique. Il correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Les fluorochromes ont des rendements quantiques compris entre 0.1 et 1. Le dernier critère est le coefficient d'extinction. Plus ce coefficient est grand, plus la fluorescence sera élevée pour une intensité lumineuse d'excitation égale.

2.2 Marquages immunofluorescents sur tranche de cerveau

Lors de mon travail de thèse, j'ai réalisé des doubles marquages immunofluorescents sur coupe de cerveau de 20 μm d'épaisseur. J'ai utilisé un marquage spécifique des neurones à l'aide de l'anticorps primaire monoclonal de souris NeuN. La protéine NeuN est localisée dans le noyau et le périkarion des neurones (Schauwecker, 2010). L'anticorps primaire anti NeuN est reconnu par un anticorps secondaire de chèvre anti souris couplé à un fluorochrome, l'Alexa 488. J'ai également utilisé comme deuxième marquage un intercalant de l'ADN : le DAPI. Il marque tous les noyaux, à la fois neuronaux et gliaux. L'acquisition des images a été effectuée à l'aide d'un microscope Leica SP5. L'Alexa 488 a un maximum d'absorption à 488 nm et son maximum d'émission se trouve à 519 nm. Lors de notre acquisition d'image, on a déterminé une fenêtre de détection entre 510 et 613 nm. En ce qui concerne le DAPI, son maximum d'absorption se trouve à 372 nm et son maximum d'émission se situe à 456 nm. On a choisi lors de nos acquisitions une fenêtre d'émission entre 418 et 473 nm. Nos acquisitions ont été faites en mode séquentiel pour éviter les interférences possibles entre les 2 canaux d'acquisition. Pour diminuer le bruit photoélectronique, le laser passe plusieurs fois sur le même plan en z. Concernant les images vertes, le laser effectue 3 passages et pour les images bleues, le laser effectue 2 passages pour chaque plan en z.

3. Détection de l'immunofluorescence : le microscope confocal

3.1 Principe général

Le principe du microscope confocal a été décrit en 1957 par Minsky. Un microscope confocal permet de réaliser des images de faible profondeur de champ, appelées sections optiques. En microscopie à épifluorescence, dite classique, un des désavantages est la présence de bruit de fond lié à l'épaisseur de l'objet. Une image nette est difficile à obtenir en raison de l'excitation de fluorophores en dehors du plan focal. Du bruit de fond provenant des plans supérieurs et inférieurs se superpose à l'image du plan observé. Ceci est dû à une

excitation par le laser de tous les fluorochromes situés sur le trajet lumineux. Le microscope confocal permet de supprimer la lumière provenant des coupes optiques supérieures et inférieures. Des trous de filtrage (pinholes) sont positionnés devant la source lumineuse et devant le détecteur et laissent passer uniquement les photons provenant du plan focal. La fluorescence hors champ est bloquée.

Pour notre étude, un microscope confocal à balayage laser a été utilisé, c'est-à-dire qu'un laser est utilisé comme source de lumière et balaye point par point l'objet à analyser. Le balayage laser peut être effectué de deux manières. Premièrement, par déplacement en XY de l'objet sous un faisceau fixe. Deuxièmement, par la présence de miroir de balayage dont la rotation permet la modification de l'angle d'incidence d'illumination du faisceau laser sur l'échantillon. Un miroir dichroïque est également présent et permet de séparer la lumière émise par le laser de celle reçue en réponse à l'excitation de l'échantillon et de recueillir uniquement celle provenant de l'échantillon. Le signal résultant de l'excitation des fluorochromes est capté par les photomultiplicateurs. Le signal reçu est ensuite amplifié, traité pour améliorer le signal et intégré informatiquement (Figure 6).

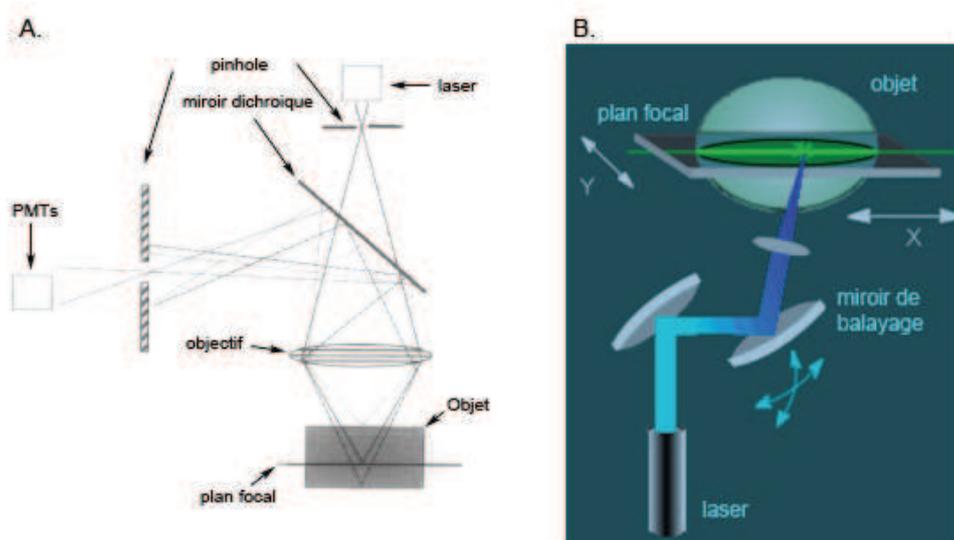


Figure 6 : Schéma du principe de la confocalité. A. Schéma du fonctionnement du microscope confocal. B. Schéma représentant les miroirs de balayage permettant le balayage laser en XY. D'après (http://medphar.univ-poitiers.fr/Acp_med/CoursM/confocal/imp.pdf, Marksteiner et al., 1990).

3.2 Convention de couleur

Le signal d'excitation de l'échantillon reçu par les photomultiplicateurs est transformé en un signal fonction de l'intensité lumineuse en un point donné. A chaque pixel est associée une valeur numérique proportionnelle à l'intensité lumineuse reçue. Les images ainsi obtenues après numérisation du signal sont monochromes, exprimées en niveaux de gris, représentés par des nombres de 8-bits, c'est-à-dire 256 niveaux de gris. Elles peuvent être

colorées artificiellement par des fausses couleurs. Toutes les couleurs représentées en microscopie confocal sont artificielles et suivent une correspondance répertoriée dans une table des couleurs ou LUT (Look-Up-Table). Pour une image 8-bits, il s'agit d'un tableau de 256 couleurs.

4. Le choix du seuillage, étape déterminante de l'analyse d'image

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le logiciel image J comme outil pour l'analyse d'image. Ce logiciel a l'avantage d'être gratuit et compatible avec l'ensemble des images acquises, il ne dépend pas du type de microscope utilisé. Il permet de traiter de façon automatique et identique les images à analyser. Pour notre analyse d'image, nous avons utilisé des fonctions présentes dans ce logiciel. L'étape cruciale pour la quantification est le choix du seuillage automatique. Image J possède 16 seuillages différents. Cela permet de séparer correctement les objets du fond. Pour établir une quantification correcte, il est très important de choisir un seuillage adapté. Chaque pixel de l'image possède un niveau de gris variant de 0 (noir) à 255 (blanc) pour une image codée sur 8 bits. L'image peut ainsi être représentée par un histogramme représentant les 256 niveaux de gris et leur fréquence d'apparition dans l'image (figure 7, A3 et B3). Comme sur nos images, le fond est largement présent, cela forme un pic tandis que les objets (les neurones) sont définis par une trainée de point car ils n'ont pas une intensité homogène. Le seuillage consiste à binariser l'image pour la représenter en noir et blanc. Pour cela, un seuil est défini en dessous duquel l'intensité des pixels est fixée à zéro, et à 1 au dessus. Un bon seuillage consiste à fixer à zéro la valeur des pixels du fond et à 1 ceux correspondant aux objets (figure7, A2, A3) tandis qu'un mauvais seuillage fixe à 1 des pixels appartenant également au fond (figure 7, B2, B3). Notre macro propose 16 différents seuillages automatiques : Huang, Li, Moments, etc.....Nous avons déterminé empiriquement que la méthode Moments permettait une quantification reproductible dans les zones où les neurones sont espacés comme le cortex, le thalamus, l'amygdale, le hile et le cortex alors que la méthode Li convient pour les zones où les neurones sont serrés les uns contre les autres comme l'hippocampe CA1 et CA3 ou dans le gyrus denté.

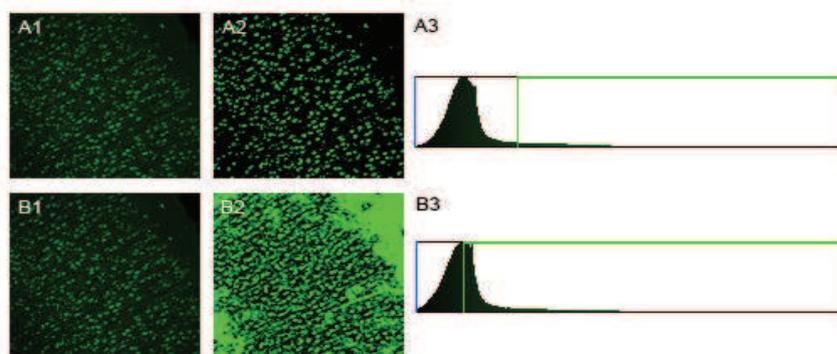


Figure 7 : Exemple du seuillage d'une image de cortex de rat. A1, B1 : image de départ. A2, B2 : image seuillée. A3, B3 : histogramme représentant l'intervalle de seuillage utilisé.

III. Régulation de la D-sérine *in vivo*

Chapitre 1

D-Serine diffusion through the blood-brain barrier: effect on D-serine compartmentalization and storage

Dans ce chapitre, grâce à nos biocapteurs enzymatiques développés au laboratoire, nous avons pu évaluer la diffusion de la D-sérine à travers la barrière hématoencéphalique en occasionnant des dommages minimes ainsi qu'estimer la concentration de D-sérine présente dans différents compartiments. Cet article a été publié dans *Neurochemistry international* en mars 2012 (*Neurochemistry International* 60 (2012) 837–845).

D-SERINE DIFFUSION THROUGH THE BLOOD-BRAIN BARRIER: EFFECT ON D-SERINE COMPARTMENTALIZATION AND STORAGE

Pierre PERNOT^{1,2}, Caroline MAUCLER^{1,2}, Yannick THOLANCE^{1,2,3}, Natalia VASYLIEVA^{1,2,4}, Gabriel DEBILLY^{1,2}, Loredano POLLEGIONI⁵, Raymond CESPUGLIO^{1,2} and Stéphane MARINESCO^{1,2,}*

¹INSERM U1028; CNRS UMR5292 Lyon Neuroscience Research Center, Plate-forme technologique AniRA-Neurochem, Team WAKE, Lyon, F-69000, France.

²University Lyon 1, Lyon, F-69000, France.

³Neurobiology Laboratory, Department of Biochemistry, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

⁴Institut de Nanotechnologie de Lyon, CNRS UMR-5270, INSA de Lyon, France.

⁵Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita, Università degli studi dell'Insubria, Varese, and Centro Interuniversitario di Ricerca in Biotecnologie Proteiche "The Protein Factory", Politecnico di Milano, ICRM-CNR Milano, Italy.

* Corresponding author: Stéphane Marinesco, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France.

Tel: +33 (0)4 78777041, Fax: +33 (0)4 78777150, Email: stephane.marinesco@univ-lyon1.fr

Keywords: in vivo, rat, electrochemistry, amperometry, serum, intracellular stores, interstitial fluid

Abstract

D-serine is a co-agonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. It has been implicated in the etiology of schizophrenia and has shown efficacy as an adjuvant to reduce positive and negative symptoms of schizophrenia. In addition, D-serine can modulate cognition in animals when administered alone. However, the neurochemical effects of exogenous D-serine on extra- and intracellular D-serine brain levels are poorly understood. In this study, we used both high performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme-based microelectrode biosensors to quantify D-serine in the rat brain. We demonstrated levels of 2.3-2.8 μM in the extracellular medium, 4 μM in plasma and 188 pmol/mg in brain tissue samples. An intraperitoneal (i.p.) D-serine injection (1 g/kg) produced a slow increase in extracellular D-serine concentration in the cortex despite a surge in D-serine up to 13 mM in the plasma, indicating poor diffusion through the blood-brain barrier. Using the respective volume fractions of blood, extracellular and intracellular spaces published in the literature, we estimated that D-serine intracellular stores represented more than 99% of total D-serine. These intracellular stores almost doubled 3 h after D-serine administration. Overall, our data indicate that D-serine administration increases brain extra- and intracellular concentrations despite weak diffusion through the blood-brain barrier. These results pave the way for a better understanding of the neurochemical mechanisms by which D-serine administration modulates cognition.

Highlights

- Brain D-serine is concentrated in intracellular stores.
- D-serine diffuses poorly through the blood-brain barrier.
- D-serine administration changes its intra- and extracellular concentrations in the brain.

1. Introduction

D-serine is present in forebrain regions of the vertebrate central nervous system (CNS) and is enriched in glial cells, where it functions as a gliotransmitter (Oliet and Mothet, 2006, Williams et al., 2006). D-serine binds to N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and competes with glycine at the co-agonist binding site on the NR1 subunit (Mothet et al., 2000b). As an NMDA receptor coagonist, D-serine has been implicated in most NMDA-related physiological functions, such as synaptic plasticity (Panatier et al., 2006, Henneberger et al., 2010) and brain development (Kim et al., 2005). It is also involved in several neurological and psychiatric diseases. Excessive D-serine is believed to contribute to NMDA receptor overactivation and excitotoxic neuronal insult during ischemia (Shleper et al., 2005, Katsuki et al., 2007, Kirschner et al., 2009a), amyotrophic lateral sclerosis (Sasabe et al., 2007, Thompson et al., 2011) and Alzheimer's disease (Hashimoto et al., 2004). Conversely, insufficient brain D-serine levels and NMDA receptor hypoactivation may contribute to the etiology of schizophrenia (Coyle and Tsai, 2004, Labrie et al., 2011). In fact, oral D-serine administration as an adjuvant to classical antipsychotic treatment has been shown to ameliorate both positive and negative symptoms of schizophrenia (Tsai et al., 1998, Heresco-Levy et al., 2005, Lane et al., 2010). Oral D-serine has also been shown to alleviate behavioral and motor symptoms in Parkinson's disease when administered as add-on therapy to on-going medications such as L-DOPA (Gelfin et al., 2011). In addition, D-serine may improve the extinction of traumatic memories in post-traumatic stress disorder (Heresco-Levy et al., 2009).

D-serine can also modulate cognition in animals. Peripheral D-serine injection improves spatial memory (Zhang et al., 2008) and novel object recognition memory (Smith et al., 2009, Bado et al., 2011). Interestingly, D-serine also improves the extinction of fear-conditioning (Matsuda et al., 2010) and of cocaine-induced conditioned place preference (Yang et al., 2010a). However, the neurochemical mechanisms by which peripheral D-serine administration exerts effects on cognitive performance are still unclear. In particular, the extent to which exogenous administration alters brain D-serine concentration and hence modulates NMDA receptors has not been well characterized.

Investigating the diffusion of neuroactive molecules through the blood-brain barrier is a difficult technical challenge. Invasive sampling techniques like microdialysis can damage blood vessels and overestimate the diffusion of the molecule of interest into the brain. Radioactive tracers may also overestimate, as they do not differentiate the fraction of the molecule that is metabolized and thus inactivated from the fraction that retains its biochemical activity. We recently developed enzyme-based microelectrode biosensors that can specifically detect D-serine in the brain (Pernot et al., 2008). The small size of these biosensors (sensing tip 40 μm in diameter and 100 μm in length) offers a potentially attractive method for investigating D-serine diffusion into the brain with minimal damage to the blood-brain barrier.

This study combined the use of these microelectrode biosensors with high-performance liquid chromatography (HPLC) to quantify D-serine concentrations in the extracellular space, blood and whole brain tissue and to estimate the amount of D-serine

stored in intracellular compartments in the rat. We then quantified the effects of peripheral D-serine administration on its concentration in these different brain compartments.

2. Materials and Methods

2.1 Microelectrode biosensor recordings

D-Serine microelectrode biosensors were prepared as previously described (Pernot et al., 2008, Vasylyeva et al., 2011). Briefly, the biosensors consisted of a 25 μm 90% Pt/10% Ir wire (Goodfellow, Huntington, UK) with a tip that protruded from a pulled glass micropipette by 100 μm . The platinum wire was coated with an electropolymerized layer of poly-m-phenylenediamine (PPD) and a manually-deposited layer of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase (DAAO, EC 1.4.3.3., Pollegioni et al., 1997, Pollegioni et al., 2008), immobilized by cross-linking with glutaraldehyde (Pernot et al., 2008) or poly (ethylene glycol) diglycidyl ether (Vasylyeva et al., 2011). Amperometric recordings were performed using a VA-10 electrochemistry amplifier (NPI electronics, Tamm, Germany) with a two-electrode potentiostat (500 M Ω feedback resistor) connected to an ITC-18 acquisition board (Instrutech, Port Washington, NY) and controlled by homemade software based on Igor Pro 6.0 procedures (Wavemetrics, Eugene, OR). The holding potential for amperometric recordings was set to 500 mV versus Ag/AgCl, and the oxidation current was sampled at 1 kHz with a 20 Hz low-pass filter and averaged over 1000 points, yielding a final sampling frequency of 1 Hz. Biosensors were calibrated for D-serine and serotonin (5-HT) detection in phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4) before and after *in vivo* recordings. If the biosensor sensitivity diminished by more than 25% during the course of the *in vivo* recording, or if the PPD screening layer lost its efficacy (more than 1 pA/10 μM 5-HT detected), data from that experiment were discarded. This happened in about 5-10% of the experiments.

2.2. Animals and *in vivo* experiments

In vivo experiments were performed on male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) weighing 250–350 g. All experimental protocols were approved by the local committee on animals in research at the University Claude Bernard Lyon I and were performed in accordance with European directive 86/609/CEE. Rats were anesthetized by i.p. administration of ketamine-xylazine (80 mg/kg ketamine, 4 mg/kg xylazine for induction, then continuous perfusion of 1–1.2 mg/kg/min ketamine, 50–60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ xylazine) or urethane (1.5–2 g/kg, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). After basal D-serine levels in the frontal cortex were demonstrated to be similar under ketamine-xylazine ($3.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$) and urethane anesthesia, all further experiments were performed under urethane anesthesia. Rats were immobilized in a stereotactic apparatus (Stoelting Corporation, Wood Dale, IL), and body temperature was maintained at 37 °C using a homeothermic blanket (*LSI Letica*, Barcelona, Spain). An Ag/AgCl reference electrode was placed on top of the skull and regularly wetted with PBS to maintain electrical contact. Biosensors were implanted in the frontal cortex (all coordinates in mm from Bregma: 3.0 AP, ± 1.0 ML, -1.5 DV), hippocampus

(-3.5 AP, ± 2 ML, -3 DV), cerebellum (-11.2 AP, ± 1 ML, -1.5 DV), lateral ventricle (-0.9 AP, ± 1.5 ML, -3.0 DV) or *cisterna magna* (-11.7 AP, ± 0.0 ML, -9.4 DV with a 30° angle). Simultaneously, a D-serine biosensor was inserted into the area of interest and a control biosensor coated with bovine serum albumin (BSA) was inserted contralaterally at the same coordinates (Fig. 1A). The control biosensor detects the same currents as the D-serine biosensor (i.e. endogenous oxidizable molecules, pH changes, and endogenous peroxide) with the exception of D-serine, and both control and D-serine biosensors record 10–15 pA of background current in PBS (Fig. 1B). Amperometric recordings began between 60 and 90 min after implantation, once the electrochemical current recorded by the biosensor had stabilized. At the conclusion of the experiment, to estimate *in vivo* extracellular D-serine concentrations, the oxidation current recorded by the biosensor was divided by its sensitivity in standard solutions.

2.3. Brain and serum samples

For brain samples used in HPLC experiments, rats were decapitated under isoflurane anesthesia. The brain was quickly extracted and 2–3 mL of blood was collected in a microcentrifuge tube. The cerebrum and cerebellum/brainstem were separated before freezing in liquid nitrogen. Brain tissue from the cerebrum was then homogenized in 5 ml of 5% trichloroacetic acid (TCA) to precipitate macromolecules. The homogenates were centrifuged at 8,000 $\times g$ for 15 min, and supernatant was subjected to six extractions with ether before storage at -80 °C. D-serine concentration in was then determined with HPLC.

Blood samples were taken from 4 groups of rats at different time points ($n = 6$): before D-serine administration (1 g/kg, i.p.), and 30 min, 1 h and 3 h after administration. Trunk blood was collected after decapitation and centrifuged at 2,000 $\times g$ for 15 min. Serum was then treated identically to supernatant from brain tissue (precipitation with TCA, centrifugation and extraction with ether). D-serine concentration was then determined with HPLC.

For determination of brain density, brains were extracted from six deeply anesthetized rats and weighed. Brains were then placed two at a time into a 10 mL graduated cylinder, and 3 mL of water was added to completely cover the brains and eliminate air bubbles. The total volume of the two brains was defined as the level on the cylinder minus 3 mL, and this value was used to compute brain density.

2.4. Perfusion

To eliminate blood from brain samples, deeply anesthetized animals were perfused through the aorta with warm Ringer's solution (NaCl 8, KCl 0.2, CaCl₂ 0.1342, NaHCO₃ 20 and glucose 1 in g/L, CDM Lavoisier, France) containing 5,000 U/L heparin (Heparine choay, Sanofi-Aventis, France) for 2–3 min, then for 10 min with Ringer's solution at 4 °C (40 mL/min). To evaluate the efficacy of the perfusion, animals were injected with 200 mg/kg

fluorescein (i.p.), then decapitated 1 h later and perfused with Ringer's solution. Brains were then homogenized, and proteins were precipitated using TCA prior to centrifugation (see detailed methods above). The supernatant was diluted in a final volume of 25 mL of PBS (0.01 M, pH 7.4), and fluorescence was measured by a GENios Pro XFluor 4 (TECAN, Trappes, France) with 486 nm excitation and 535 nm emission filters.

2.5. HPLC

HPLC measurements were performed using a Waters Alliance instrument (Waters Corporation, Guyancourt, France) with a Waters symmetry column (4.6 × 250 mm). The column and sample compartments were kept at 30 and 8 °C, respectively. Flow rate was set at 1 ml/min and run time was 20 min for all analyses. Amino acid standards and brain samples were derivatized in 50 µl aliquots treated with 0.8 mg N-acetyl-cysteine and 0.25 mg *o*-phthaldialdehyde in a 0.1 M borate buffer, pH 10.4. L- and D-serine were eluted with an isocratic method using phase A (990 ml of 0.1 M sodium acetate and 10 ml tetrahydrofurane, pH 6.2); the column was washed using phase B (500 ml of 0.1 M sodium acetate, 470 ml acetonitrile, 30 ml tetrahydrofurane, pH 6.2). Amino acid derivatives were detected using a Waters fluorescence detector (excitation 344 nm, emission 443 nm), and data were acquired using the Empower Pro software package (Waters Corporation, Guyancourt, France). Calibration of D-serine detection was performed using a 7-point standard curve.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons between two groups were performed using a Student's t test for equal or unequal variance according to the F test (Excel Statistics toolpack). Statistical comparisons of three or more groups were performed using an ANOVA followed by Fisher's LSD post hoc test (SPSS 12.0).

3. Results

3.1. Basal D-serine levels

The current detected by the D-serine biosensors *in vivo* was higher than that detected by the control biosensors, revealing the presence of D-serine in the interstitial fluid. Following a stabilization period of 60 to 90 min, the signal detected by the D-serine sensor did not show any noticeable spontaneous variations. As shown in Figure 1B, the difference in the current detected by D-serine versus control biosensors was 37.8 ± 7.2 pA in the frontal cortex ($n = 13$, $p < 0.01$), 42.4 ± 6.5 pA in the hippocampus ($n = 7$, $p < 0.01$), but only 5.5 ± 5.2 pA in the cerebellum, ($n = 11$, $p = 0.3$). Within the cerebrospinal fluid, D-serine oxidation currents were higher in the lateral ventricle (85.7 ± 11.2 pA, $n = 6$, $p < 0.01$) than in the *cisterna magna* (36.2 ± 7.7 pA, $n = 6$, $p < 0.01$).

Following normalization of the sensitivity of each sensor, calibrated after each experiment (mean of 16 pA/ μ M), the current difference represented a basal concentration of 2.3 ± 0.4 μ M D-serine in the frontal cortex and 2.8 ± 0.4 μ M D-serine in the hippocampus (Fig. 1C). In the cerebellum, no significant difference in current was detected between the D-serine and control sensors, likely because the extracellular concentration of D-serine in the cerebellum was below the detection limit of our D-serine biosensors *in vivo*, which was estimated to be around 0.6 μ M (see supplementary material). In the cerebrospinal fluid (CSF), D-serine concentration was estimated to be 5.4 ± 0.7 μ M in the lateral ventricle and 1.6 ± 0.3 μ M in the *cisterna magna*. Statistical analysis revealed that D-serine was present in similar amounts in cortex, hippocampus and *cisterna magna*, but levels were significantly higher in the lateral ventricle [$F(3,24) = 10.4$, $p < 0.01$].

3.2. Effect of peripheral administration of D-serine on extracellular concentrations

After peripheral administration of D-serine (1 g/kg, i.p.), levels in the frontal cortex increased slowly from a baseline value of 2.3 ± 0.4 μ M to 7.4 ± 1.1 μ M (Fig. 2AC, $p < 0.01$). In contrast, D-serine increased more rapidly in the CSF. In the lateral ventricle, D-serine increased from 5.4 ± 0.7 μ M to 28.3 ± 3.8 μ M in about 45 min, then decreased slowly to 19.3 ± 3.2 μ M by 3 h (Fig. 2BC, $p < 0.01$). The kinetics of D-serine diffusion through the blood-brain and blood-CSF barriers were clearly different. However, because the lateral ventricle is a deeper brain structure (DV: 3 mm) than the cortex (DV: 1.5 mm), minor contamination from blood cannot be excluded in our CSF measurements.

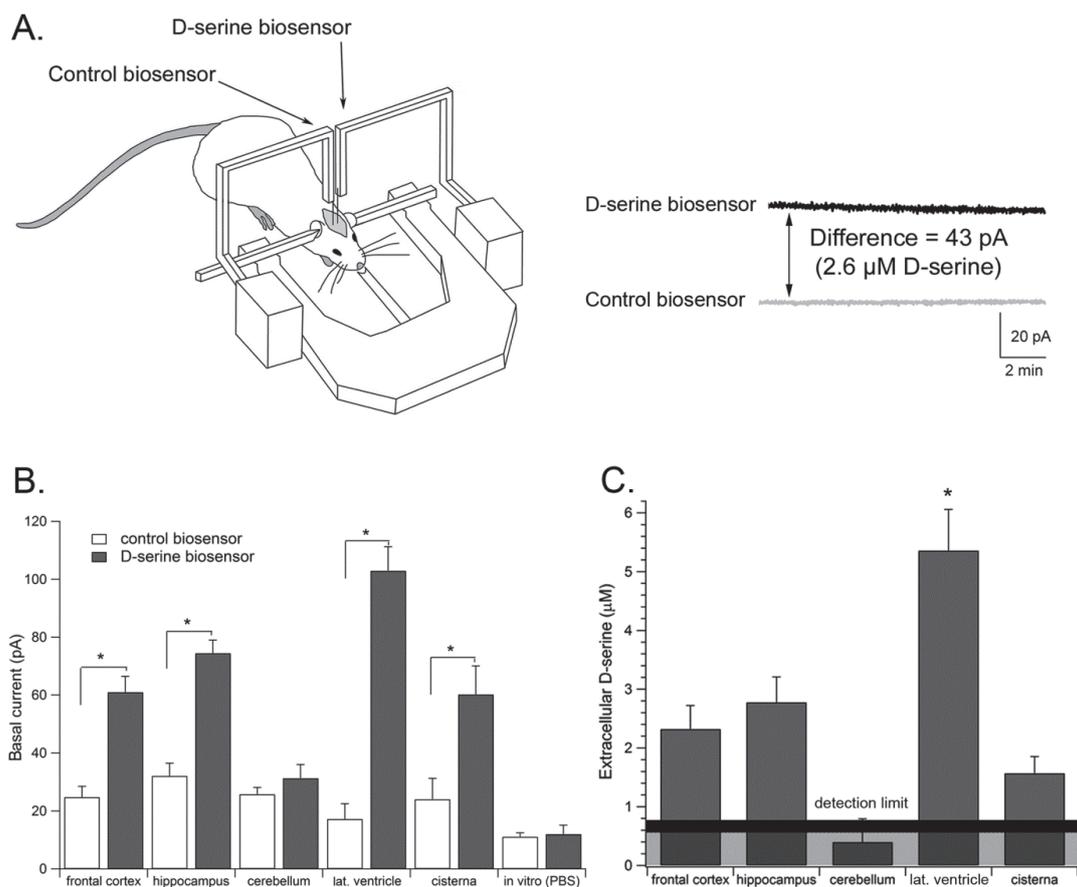


Figure 1. Basal D-serine levels in the rat brain. **A.** Left: schematic representation of the experimental procedure in which a D-serine biosensor (coated with DAAO) and a control biosensor (coated with BSA) are implanted simultaneously in the frontal cortex. Right: representative recording from the frontal cortex. The difference in basal currents recorded by the two biosensors reveals the specific D-serine oxidation current, which represents its extracellular concentration. **B.** Basal currents measured in the rat frontal cortex (n = 13), hippocampus (n = 7), cerebellum (n = 11), lateral ventricle (n = 6), cisterna magna (n = 6) or in PBS (n = 18). **C.** Basal D-serine concentrations estimated from the oxidation currents measured *in vivo*. D-serine concentration in the cerebellum was below the *in vivo* detection limit of the biosensors, indicated by the solid line. *p < 0.05 relative to control biosensor (Student t test).

3.3. Blood D-serine concentration

Basal D-serine concentration in the serum was $4.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$, in accordance with previous measurements by Hashimoto et al. (1992b). At 30 min after D-serine administration (1 g/kg, i.p.), concentration in the serum increased dramatically to $12.9 \pm 1.3 \text{ mM}$, then decreased markedly to $7.2 \pm 0.5 \text{ mM}$ and $2.1 \pm 0.2 \text{ mM}$ at 1 and 3 h, respectively (Fig. 3). Therefore, during the 3 h following administration, there was a gradient that ranged from

300:1 (3 h) to 2000:1 (1 h) in D-serine concentration between the bloodstream and the brain extracellular fluid or CSF.

3.4. Total D-serine in brain tissue

Total brain homogenates contained 188 ± 10 pmol D-serine/mg of wet tissue (Fig. 4A, $n=12$), similar to the amounts detected by other HPLC methods (Hashimoto et al., 1992b, Hashimoto, 2002). At 3 h after D-serine injection (1 g/kg), D-serine amounts increased to 415 ± 11 pmol/mg wet tissue (Fig. 4B, $n=6$). By contrast, L-serine amounts did not increase significantly at 3 h after D-serine administration (566 ± 40 pmol/mg) relative to controls (531 ± 18 pmol/mg) ($n = 6$, data not shown).

D-serine concentration increased about 1000-fold in the bloodstream after i.p. administration, which could have impacted total brain D-serine levels. Therefore, we replicated these measurements in animals that had been perfused to decrease the amount of blood D-serine. In brains from perfused animals ($n = 6$), basal D-serine levels were 149 ± 10 pmol/mg of wet tissue, which increased significantly to 388 ± 25 pmol/mg at 3 h after D-serine administration ($n=6$). An ANOVA followed by LSD post-hoc test revealed that D-serine injection had a significant effect of D-serine brain tissue levels ($[F(3, 26) = 80.7, p < 0.01]$). D-serine injection increased tissue levels significantly in both perfused and non-perfused animals ($n = 6, p < 0.01$). Moreover, perfusion tended to slightly but non-significantly decrease brain D-serine levels compared to the standard brain sampling technique, possibly because it introduced a delay for freezing the tissue.

To estimate the fraction of blood D-serine that was removed by perfusion, rats received fluoresceine (200 mg/kg, i.p.), a fluorescent marker that does not cross the blood-brain barrier (Hawkins and Egleton, 2006). The fluorescence of our brain samples at 535 nm decreased by 57% (Fig. 4C, non-perfused: 1.18 ± 0.04 , perfused: 0.51 ± 0.07 , relative fluorescence units, $n = 6, p < 0.01$). Thus, we estimate that the amount of blood D-serine removed from brain capillaries by perfusion was approximately 57%. The remaining 43% D-serine was probably present in small capillaries that were not efficiently washed by our perfusion method, or adsorbed on the blood vessel walls.

3.5 Comparison with L-serine

As a comparison we performed a similar experiment with L-serine (1 g/kg, i.p.). L-serine significantly increased whole-brain L-serine levels from 531 ± 18 pmol/mg to 1014 ± 40 pmol/mg wet tissue at 3 h with no noticeable changes in D-serine levels (Fig. 4D, $n=6, p < 0.01$). Therefore, i.p. administration of L-serine increased the total L-serine tissue levels to a greater extent (+483 pmol L-serine/mg) than D-serine tissue levels after D-serine administration (+221 pmol D-serine/mg wet tissue).

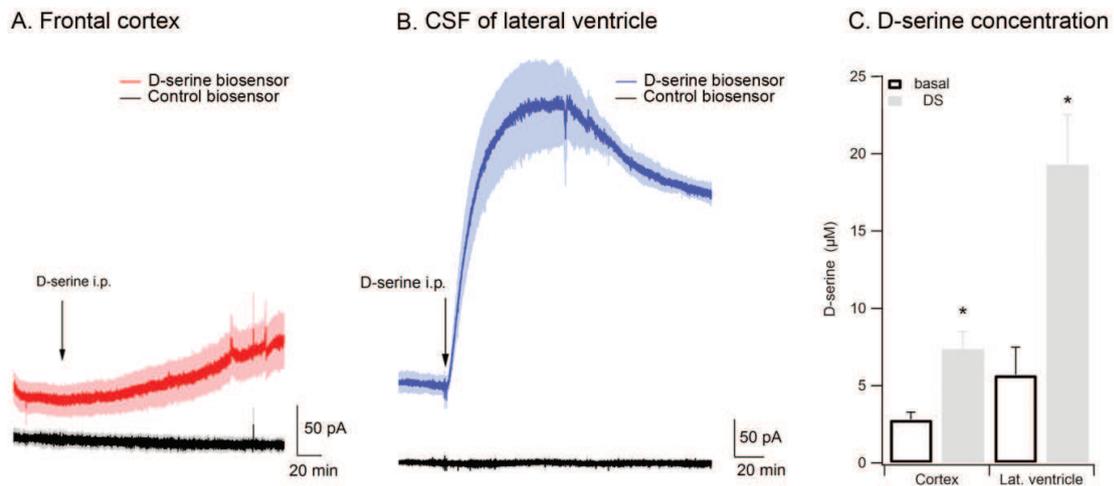


Figure 2. Extracellular D-serine after i.p. administration. D-serine recordings in the frontal cortex (A, red trace) and in CSF of the lateral ventricle (B, blue trace). The solid line and shading represent the mean and SEM, respectively. C. D-serine concentrations in the cerebral cortex and lateral ventricle at baseline and 3 h after administration. * $p < 0.05$ relative to basal levels (Student t test, $n = 6$). DS, D-serine.

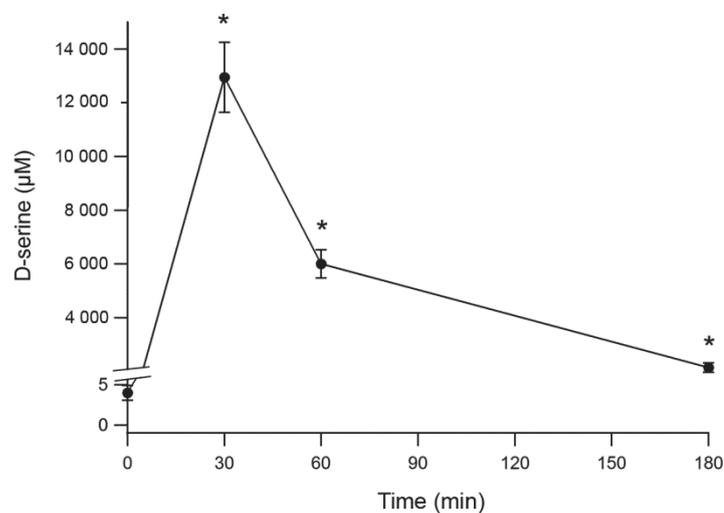


Figure 3. Serum D-serine after i.p. administration. D-serine concentration in the serum, quantified using HPLC, showed a significant increase immediately after administration, which declined but remained above baseline levels until at least 3 h. * $p < 0.05$ relative to basal level (ANOVA with LSD post-hoc, $n = 6$).

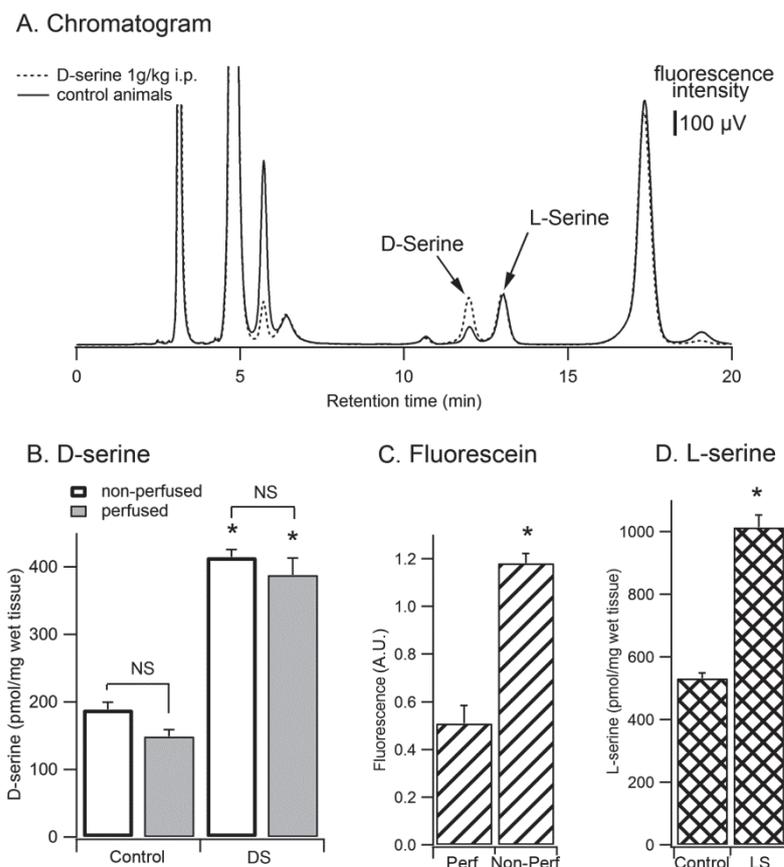


Figure 4. Total D-serine in brain homogenates. **A.** Representative chromatograms of rat brain homogenates from a control rat (solid line) and a rat administered D-serine 3 h earlier ($n = 12$). The D-serine peak appears at 13 min. **B.** D-serine in the cerebrum of control rats or rats administered D-serine (1 g/kg, i.p.) 3 h earlier, with perfusion or no perfusion. ($n = 6$) **C.** Fluorescence intensity of brain homogenates from rats injected with fluorescein (200 mg/kg, i.p.) with or without perfusion. Perfusion removed 57% of the fluorescein present in blood vessels ($n = 6$). **D.** L-serine amounts in the cerebrum of control rats or rats administered L-serine (1 g/kg, i.p.) 3 h earlier. DS, D-serine; LS, L-serine; Perf, perfused; Non-Perf, non-perfused. ($n = 6$).

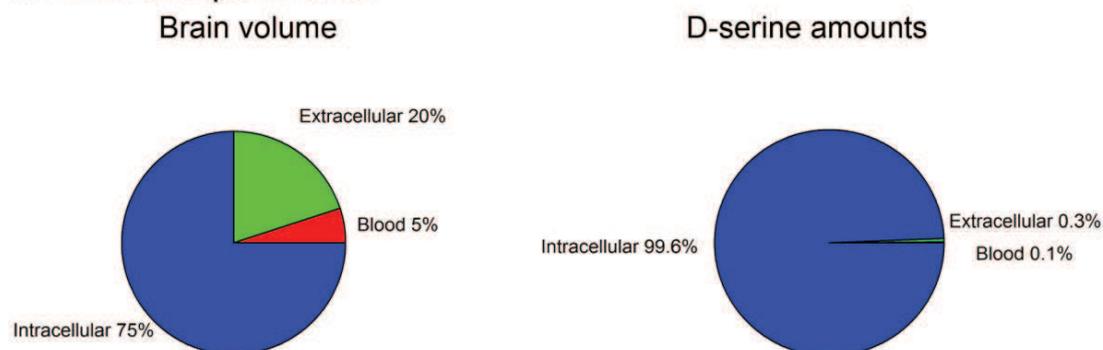
3.6. Computing intracellular stores of D-serine

Brain tissue can be divided into three separate compartments: blood, extracellular space and intracellular space. Theoretical models based on ion diffusion experiments determined that these three compartments represent 5%, 20%, and 75% of total brain volume, respectively (Fig. 5A, Nicholson and Sykova, 1998). Our HPLC and biosensor experiments quantified D-serine concentrations in blood and extracellular space (in μ M), as well as the total contents (in pmol/mg of wet tissue, Fig. 5B).

We first calculated rat brain density value to be 1.033 ± 0.002 (from 6 freshly sampled rat brains weighing 1.936 ± 0.028 g with volume 1.875 ± 0.029 mL). Next, using this density value, we converted the total brain D-serine concentration from 188 ± 10 pmol/mg of wet tissue to 182 ± 10 μ M. The total brain volume being composed of 5% blood (4 μ M D-serine) and 20% extracellular medium (2 to 3 μ M D-serine), the remaining intracellular space contained a D-serine concentration that we estimated at 242 μ M ($[182 - 4 \times 0.05 - 2 \times 0.2] / 0.75$). The same computation with our data obtained in perfused animals (assuming that 57% of the blood was removed from the brain, and that extracellular D-serine levels were unchanged) yielded a slightly lower estimate of D-serine intracellular concentration of 190 μ M. Therefore, D-serine was concentrated by a factor of ~ 100 in the intracellular compartment, which represented 99.5 to 99.6% of the total D-serine present in the brain (Fig. 5A).

At 3 h after D-serine administration (1 g/kg, i.p.), intracellular concentration was estimated to be 394 μ M (using data from non-perfused animals) or 442 μ M (perfused animals, Fig. 5B). Therefore, both estimations indicated that intracellular stores of D-serine nearly doubled by 3 h after administration.

A. Brain compartments



B. Effects of D-serine administration

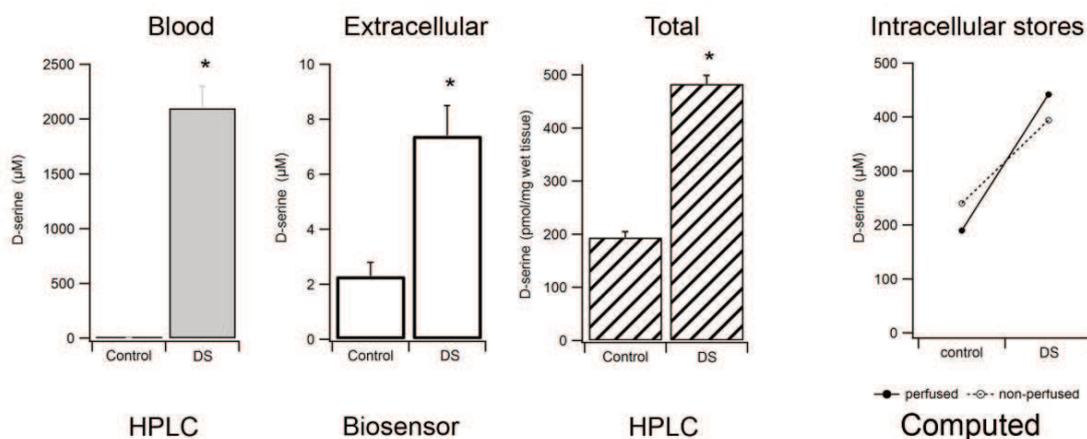


Figure 5. Brain D-serine compartmentalization before and after i.p. administration. A. The brain can be separated into three compartments, blood, extracellular space and intracellular space, representing 5%, 20%, and 75% of the total brain volume, respectively. D-serine present in the intracellular compartment represented more than 99% of total brain D-serine. **B.** Left: D-serine concentrations in blood, extracellular space and whole brain before and after D-serine (1 g/kg, i.p.). Right: Estimate of D-serine concentration in intracellular stores (right). See text for details on calculations. DS, D-serine.

4. Discussion

To quantify D-serine with minimal perturbation to the brain, we developed an enzymatic microelectrode biosensor based on the use of a high-affinity DAAO isoform for the detection of D-serine. This biosensor minimizes potential tissue lesions and inflammatory responses to implantation (Pernot et al., 2008, Vasylieva et al., 2011).

4.1. Specificity and quantitative estimation of D-serine using microelectrode biosensors

The enzyme DAAO is not specific for D-serine, as it oxidizes neutral D-amino acids like D-alanine, D-proline, and D-serine (Pollegioni et al., 1992b). However, DAAO-based microbiosensors may be considered selective for D-serine in the CNS *in vivo*, as the CNS is highly enriched in D-serine compared to other neutral D-amino acids (Hamase et al., 2005). We previously demonstrated a negligible difference (6%) between D-serine concentrations estimated by our biosensors and those measured using HPLC in rat brain homogenates (Pernot et al., 2008).

In the present study, the selectivity of the DAAO-based biosensor for D-serine was further supported by the low estimates of basal D-serine concentrations. Furthermore, as expected based on previous reports, low oxidation currents were measured in the cerebellum, a brain structure known to be devoid of D-serine in adulthood, while high levels were found in the frontal cortex and hippocampus (Schell et al., 1997, Williams et al., 2006).

HPLC is usually regarded as a more sensitive technique than biosensors, providing lower D-serine detection limits. For example, low D-serine levels can be measured in the cerebellum using HPLC, but not using biosensors (Horio et al., 2011). In addition, several amino acids can be analyzed simultaneously on the same chromatogram whereas current biosensors can only detect one molecule at a time. However, the small size of our biosensors is important for reducing the extent of tissue damage upon implantation of the probe, which is a crucial advantage in our study of D-serine diffusion through the blood-brain barrier.

From a methodological point of view, the slow increase in D-serine extracellular concentration in response to D-serine injection argues in favor of the microelectrode biosensor technology over other techniques. In a previous study using microdialysis, Fukushima et al. (2004) found a 6-fold increase in D-serine extracellular concentration at 30 min to 1 h after injection of only 50 mg/kg D-serine (20 times less than in the current study,

which observed a 2-fold increase). In addition, Ferraris et al. (2008) also detected changes in D-serine extracellular levels by microdialysis using doses as low as 30 mg/kg in rats. It is likely that the microdialysis probes disrupted the integrity of the blood-brain barrier, leading to supra-physiological levels of D-serine in the brain parenchyma due to diffusion from the intracellular compartment and blood. Therefore, biosensors of micrometric size seem preferable for studies requiring maintenance of blood-brain barrier integrity. The slow and modest increase in D-serine levels detected by our implanted microbiosensors following peripheral D-serine injection suggests that damage to the blood-brain barrier was indeed minimal. In particular, the kinetics of the increase in D-serine concentration in the extracellular medium did not follow those of the plasma D-serine concentration, indicating that the D-serine concentration in the two compartments varied independently. Moreover, the average distance between brain capillaries in the cortex is $\sim 15 \mu\text{m}$ (Tsai et al., 2009), and no more than 10–20 capillaries could be injured upon microelectrode implantation. Whereas such minimal damage to the blood-brain barrier is clearly demonstrated in the cortex, the effects of biosensor penetration in deeper brain structures remain to be determined.

4.2. Determination of D-serine concentrations in different brain compartments

Microelectrode biosensors provide a valuable technique to estimate extracellular D-serine concentrations. In the brain parenchyma, our biosensors measured concentrations of $2.3 \mu\text{M}$ (frontal cortex) and $2.8 \mu\text{M}$ (hippocampus), which was 2–3-fold lower than those estimated by microdialysis ($5.75\text{--}8.5 \mu\text{M}$) (Hashimoto et al., 1995b, Ciriacks and Bowser, 2004, Collombet et al., 2006b, Ferraris et al., 2008). This difference was possibly due to the minimal damage associated with the use of microelectrode biosensors versus microdialysis probes (Borland et al., 2005), or to differences between awake and anesthetized animals. Interestingly, D-serine concentrations in the CSF were found to differ between the *cisterna magna* ($1.6 \mu\text{M}$) and the third lateral ventricle ($7 \mu\text{M}$). The reason for these differences is not clear, but these data suggest that the ventricular network of the CNS is not homogenous for D-serine concentration. We speculate that D-serine levels decline in CSF exposed to more caudal brain regions, which have low D-serine concentration and high endogenous activity of the degrading enzyme DAAO, thus increasing reuptake and degradation, respectively.

To quantify D-serine in the serum or and in forebrain homogenates, we used a more conventional HPLC method. Our method differed from that developed by Hashimoto et al. (1992b) in that we used N-acetyl-cysteine rather than boc-L-cysteine for derivatization. Our results were nonetheless very similar to those already published: $4 \mu\text{M}$ in the serum and 188 pmol/mg of wet tissue in forebrain homogenates.

Based on a three-compartment model of brain parenchyma, we estimated D-serine concentration within intracellular stores to be in the range of $190\text{--}240 \mu\text{M}$. This value represents an average of all D-serine present inside brain cells, but its intracellular concentration is probably not homogeneous throughout different cell types of the forebrain. The issue of D-serine intracellular storage is currently a matter of debate. In C6 glioma cell cultures, a stable astrocytic cell line, extracellular D-serine levels in the culture medium are typically ~ 50 fold higher than intracellular levels (Kim et al., 2005), suggesting an ongoing

release process and limited intracellular storage capacity. However, intracellular organelles immunoreactive to D-serine have been observed *in vitro* (Martineau et al., 2008) and *ex vivo* (Williams et al., 2006), suggesting that intracellular stores do exist in the brain. More recently, Bergersen et al (2011) detected D-serine-immunoreactive synaptic-like vesicles in hippocampal astrocytes and estimated the D-serine intravesicular concentration at about 6 mM. Our data now show these stores to contain more than 99% of the total D-serine present in the brain. It is likely that these stores are located in glial cells, especially astrocytes, radial glia and microglia (Williams et al., 2006). However, serine racemase, the D-serine synthesizing enzyme, is preferentially expressed in neurons (Miya et al., 2008) and the possibility of neuronal D-serine storage cannot be excluded.

An essential property of chemical transmitters is their ability to be stored intracellularly and released into the interstitial medium in response to an appropriate stimulus. Our quantification of D-serine intracellular stores therefore fully supports the function of D-serine as a neuro- or gliotransmitter to modulate synaptic transmission (Panatier et al., 2006, Henneberger et al., 2010).

4.3. D-serine diffusion through the blood-brain barrier and implications for NMDA receptor potentiation by exogenous D-serine administration

Small neutral amino acids (including serine) are transported across the blood-brain barrier by at least three transport systems: systems A, ASC and B⁰⁺ (Smith, 2000). Systems A and ASC are preferentially located at the capillary abluminal membrane and could be involved in D-serine efflux from the brain (Smith, 2000, Kasai et al., 2011). D-serine influx into the brain, by contrast, could be mediated by system B⁰⁺ (Czeredys et al., 2008). The IC₅₀ of these D-serine transporters is in the 10⁻⁵ to 10⁻³ M range at around 20 to 52 μM for Asc1 (Fukasawa et al., 2000a, Rutter et al., 2007), 1 mM for ASCT2 (Utsunomiya-Tate et al., 1996), and 180 μM for B⁰⁺ (Hatanaka et al., 2002). Thus, in our experimental conditions (with blood D-serine concentration at 2–13 mM), D-serine transporters at the blood-brain barrier were likely saturated and functioning at their maximal velocity. In addition, non-saturable, passive diffusion probably also occurred, as with most amino acids (Smith et al., 1987, Tayarani et al., 1987).

Despite a relatively slow and weak diffusion through the blood-brain barrier, peripheral administration of 1 g D-serine/kg nearly doubled the extracellular D-serine concentration in the cortex, and likely increased NMDA receptor activation. Since the co-agonist binding site of the receptor is not saturated under normal conditions (Danysz and Parsons, 1998), it seems likely that even small variations in D-serine levels might affect the function of the ionotropic NMDA receptor. In fact, similar doses of D-serine were found to significantly improve memory performance (Zhang et al., 2008, Smith et al., 2009, Bado et al., 2011) and accelerate memory extinction (Matsuda et al., 2010, Yang et al., 2010a).

Like D-serine, the non-essential amino acid L-serine diffuses poorly through the blood-brain barrier. In fact, the conventional method for measuring amino acid influx into the brain, *in situ* brain perfusion, is not sensitive enough to detect L-serine diffusion through the blood-brain barrier (Smith et al., 1987, Smith, 2000). Using autoradiographic technique, Bauer et al showed that D-serine brain uptake is comparatively higher than that of L-serine

(2005). Interestingly, the absolute change in L-serine brain contents in response to L-serine administration was larger (531 to 1014 pmol/mg of wet tissue = + 483 pmol/mg) than the change in brain D-serine following D-serine administration (188 to 415 pmol/mg wet tissue = +227 pmol/mg). Most likely, a fraction of the D-serine diffusing into the brain was metabolized and thus was no longer detected by HPLC or biosensor methods. These data provide indirect evidence for D-serine degradation in the forebrain. Because DAAO is expressed at very low levels in the forebrain, one likely candidate for D-serine degradation could be serine racemase, that can also function as an α,β -eliminase and is capable of degrading D-serine *in vitro* (Foltyn et al., 2005, Wolosker, 2011). However, the details of such D-serine degradation are still poorly understood.

Such degradation mechanisms could be potentially important for human therapeutic applications of oral D-serine administration. For example, D-serine has been tested successfully as an adjuvant to classical anti-psychotic treatments in schizophrenic patients (Tsai et al., 1998, Heresco-Levy et al., 2005, Lane et al., 2010, Labrie et al., 2011). D-serine has also shown promise as an adjuvant in Parkinson's disease (Gelfin et al., 2011) and may have potential in post-traumatic stress disorder (Heresco-Levy et al., 2009). However, the maximal dose of D-serine that can be safely administered to patients is limited by its potential nephrotoxicity (Ganote et al., 1974, Orozco-Ibarra et al., 2007). Therefore, pharmacological strategies aimed at inhibiting D-serine degradation in the forebrain to increase its blood-brain diffusion could have potential applications to clinical practice. For example, co-administration of D-serine with DAAO inhibitors has been shown to improve D-serine diffusion into the brain (Ferraris et al., 2008), and was more powerful in attenuating prepulse inhibition deficits induced by dizocilpine in mice than was D-serine alone (Hashimoto et al., 2009).

5. Conclusions

Through the combined use of microelectrode biosensors and HPLC detection, D-serine concentrations in different brain compartments were quantified, and the effect of peripheral D-serine administration on brain concentrations was determined. More than 99% of total brain D-serine appears to be concentrated in intracellular stores. In response to D-serine administration, D-serine extracellular and intracellular concentrations almost doubled, despite poor diffusion through the blood-brain barrier. By providing quantitative estimates of D-serine brain concentrations, this study paves the way for a better understanding of the neurochemical mechanisms by which exogenous D-serine administration modulates cognition.

Acknowledgements: This study was supported by Inserm U1028, CNRS UMR 5292 and by Université Claude Bernard Lyon I. Research was funded by a grant from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0063 Neurosense) to S.M. LP thanks the financial support of Regione Lombardia “Accordi per la Cooperazione Internazionale – Progetto Istansensor: 15764, Rif. SAL-35”. PP, CM and NV are recipients of PhD fellowships from Ministère de la Recherche. We are grateful to Aïcha Compard and Animalerie Rockefeller (SCAR) for animal care. Sophie Luco and Marine Krzisch provided valuable technical assistance for HPLC studies and *ex vivo* measurements. We thank Melanie A. Paquette-McNerlin for helpful comments on an earlier version of this manuscript. The Lyon Neuroscience Research Center is part of SFR Santé Lyon Est (UCBL, UMS 3453 CNRS, US7 Inserm).

Supporting material:

Determination of D-serine detection limit in vivo

Two different types of detection limits must be considered in biosensor studies. The first is the lowest (fast) variation in D-serine concentration that can be detected by the DAAO biosensor. This value is easily computed as the D-serine concentration that generates an oxidation current at least 3 times the noise level recorded by the biosensor. For recordings in standard solutions, our biosensor recordings show a very low level of noise (about 0.05 pA), and the detection limit is around 16 nM D-serine (16 nM D-serine, Pernot et al., 2008). *In vivo*, the electrophysiological noise corresponding to local field potentials is much higher. Using a low-pass 20 Hz filter and averaging the signal over 1 s, our biosensors recorded 1.78 ± 0.74 pA of noise, corresponding to 0.21 ± 0.08 μ M D-serine, which represents the lowest change in D-serine concentration that our biosensors can detect *in vivo*.

To estimate D-serine basal levels *in vivo*, we subtracted the current recorded by control BSA biosensors from the oxidation current detected by the D-serine biosensors. A major source of variability is the different levels of basal currents detected by individual biosensors in the brain parenchyma. For example, our control biosensors yielded basal currents of $I_0 = 26.6$ pA with a standard deviation $\sigma_0 = 10.9$ pA. To reliably detect a significant basal levels of D-serine, the current recorded by the DAAO biosensors must be significantly higher than that at control biosensors. Typically, our experiments were repeated with 6 to 10 different biosensors in different animals. For the DAAO biosensors, the standard deviation of the recorded currents was $\sigma_{DAAO} = 17.6$ pA. The minimum level of D-serine oxidation current necessary to reach the $p = 0.05$ level of significance with a Student's t test can then be estimated according to the sample size. For n 's of 6 or 10, the t value necessary to reach $p = 0.05$ is 2.228 or 2.101, respectively. The standard error of the two data groups is the defined as

$$SE = \sqrt{\frac{\sigma_0^2 + \sigma_{DAAO}^2}{n}} \quad (S1)$$

$$\text{With } t = \frac{I_{DAAO} - I_0}{SE} \quad (S2)$$

The minimum difference in current that must be detected in order to yield significant D-serine basal extracellular concentration can then be computed with:

$$I_{DAAO} - I_0 = t \times \sqrt{\frac{\sigma_0^2 + \sigma_{DAAO}^2}{n}} \quad (S3)$$

This yields a minimum difference in current of 18.8 pA ($n = 6$) or 13.8 pA ($n = 10$) and an *in vivo* detection limit for basal D-serine of 0.77 μ M ($n = 6$) or 0.56 μ M ($n = 10$), taking into account the mean sensitivity of our biosensors at 37 °C.

Chapitre 2

In Vivo D-serine Hetero-Exchange Through Alanine-Serine-Cysteine (ASC) Transporters Detected By Microelectrode Biosensors

Dans ce chapitre, nous avons étudié la recapture et la libération de la D-sérine *in vivo* et montré une implication des transporteurs ASC. Cet article a été accepté pour publication dans ACS Chemical Neuroscience en avril 2013.

In Vivo D-serine Hetero-Exchange Through Alanine-Serine-Cysteine (ASC) Transporters Detected By Microelectrode Biosensors

Caroline MAUCLER^{1,2}, *Pierre PERNOT*^{1,2}, *Natalia VASYLIEVA*^{1,2,3}, *Loredano POLLEGIONI*^{4,5}, and *Stéphane MARINESCO*^{1,2,*}

¹INSERM U1028; CNRS UMR5292 Lyon Neuroscience Research Center, AniRA-Neurochem technological platform, team WAKING, Lyon, F-69000, France.

²Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, F-69000, France.

³Institut de nanotechnologie de Lyon, CNRS UMR-5270, INSA de Lyon, France.

⁴Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita, Università degli studi dell'Insubria, Varese.

⁵“The Protein Factory”, Centro Interuniversitario di Ricerca in Biotecnologie Proteiche ICRM-CNR Milano, Politecnico di Milano and Università degli studi dell'Insubria, Italy.

* corresponding author: Stéphane Marinesco, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Team WAKING, Université Claude Bernard Lyon I, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France.

Tel : +33 (0)4 78777041, Fax : +33 (0)4 78777150, Email: stephane.marinesco@univ-lyon1.fr.

Abstract

D-Serine, a co-agonist of *N*-methyl D-aspartate (NMDA) receptors, has been implicated in neurological and psychiatric disorders such as cerebral ischemia, lateral amyotrophic sclerosis or schizophrenia. D-Serine signaling represents an important pharmacological target for treating these diseases; however, the biochemical mechanisms controlling extracellular D-serine levels *in vivo* are still unclear. D-Serine hetero-exchange through small neutral amino acid transporters has been shown in cell cultures and brain slices and could provide a biochemical mechanism for the control of D-serine extracellular concentration *in vivo*. Alternatively, exocytotic D-serine release has also been proposed. In this study, the dynamics of D-serine release and clearance were explored *in vivo* on a second-by second timescale using microelectrode biosensors. The rate of D-serine clearance in the rat frontal cortex after a microionophoretic injection revealed a transporter-mediated uptake mechanism. D-Serine uptake was blocked by small neutral L-amino acids, implicating alanine-serine-cysteine (ASC) transporters, in particular high affinity Asc-1 and low affinity ASCT2 transporters. Interestingly, changes in alanine, serine, or threonine levels resulted in D-serine release through ASC transporters. Asc-1, but not ASCT2, appeared to release D-serine in response to changes in amino acid concentrations. Finally, neuronal silencing by tetrodotoxin increased D-serine extracellular concentration by an ASC transporter-dependent mechanism. Together, these results indicate that D-serine hetero-exchange through ASC transporters is present *in vivo* and may constitute a key component in the regulation of D-serine extracellular concentration.

Keywords: electrochemical detection, amperometry, rat, extracellular concentration, interstitial fluid.

Running title: D-serine hetero-exchange *in vivo*

Introduction

D-Serine, an endogenous co-agonist of glutamatergic *N*-methyl D-aspartate (NMDA) receptors, has been implicated in human diseases related to NMDA receptor dysfunction such as schizophrenia, amyotrophic lateral sclerosis, and cerebral ischemia (Hashimoto et al., 2003, Katsuki et al., 2004, Bendikov et al., 2007, Thompson et al., 2012). The pharmacological modulation of extracellular D-serine levels is therefore an exciting avenue of research for the treatment of these pathologies. For example, an increase in D-serine may compensate for the hypoactivation of NMDA receptors observed in schizophrenia (Tuominen et al., 2005, Pollegioni and Sacchi, 2010, Calcia et al., 2012b), whereas a reduction of D-serine levels could reduce NMDA-mediated excitotoxicity in ischemia or neurodegenerative diseases (Kartvelishvily et al., 2006, Sasabe et al., 2007, Kirschner et al., 2009a, Thompson et al., 2012).

The biochemical mechanisms controlling extracellular D-serine levels *in vivo* are still a matter of debate. Concerning D-serine clearance, *in vitro* studies have shown that D-serine is taken up from the extracellular space by transporter-mediated uptake (Ribeiro et al., 2002). At least two small neutral amino acid transporters have been suggested to mediate D-serine uptake. The neuronal, Na⁺ independent alanine-serine-cysteine 1 (Asc-1) transporter (Fukasawa et al., 2000b, Nakauchi et al., 2000), has a high affinity for serine, alanine, cysteine and threonine and is selective for small neutral D- and L-amino acids (Helboe et al., 2003). Asc-1 is responsible for most of the D-serine uptake by synaptosomes (Rutter et al., 2007). Another candidate for D-serine uptake is the Na⁺-dependent alanine-serine-cysteine-threonine 2 transporter (ASCT2) (Gliddon et al., 2009), which has a high affinity for L-alanine, L-serine, L-threonine, L-glutamine, and L-asparagine, and has a comparatively lower affinity for D-serine (Utsunomiya-Tate et al., 1996). ASCT2 is predominantly expressed in glia and, despite its low affinity for D-serine, it has been implicated in D-serine uptake in cell culture studies (Hayashi et al., 1997, Ribeiro et al., 2002, Dun et al., 2007, Shao et al., 2009).

The mechanisms of D-serine release are also a matter of debate. D-Serine may be released via Ca²⁺-dependent exocytosis (Mothet et al., 2005, Martineau et al., 2008, Martineau et al., 2013) or via amino acid hetero-exchange through ASC transporters in neurons and/or astrocytes (Rosenberg et al., 2010). For example, experiments on astrocyte cultures and brain slices showed D-serine release in response to small neutral amino acids, suggesting the existence of an amino acid hetero-exchange mechanism involving D-serine release coupled to the transport of another amino acid in the opposite direction (Ribeiro et al., 2002, Rosenberg et al., 2013).

In this study, we used an enzymatic microelectrode biosensor that allows selective D-serine detection on a second-by-second time scale (Pernot et al., 2008, Pernot et al., 2012), to directly test the existence of a D-serine hetero-exchange mechanism *in vivo*. We used local delivery of D-serine, L-amino acids, or S-methyl-L-cysteine (SMLC, an Asc-1 inhibitor, Thomsen et al., 2003, Ishiwata et al., 2013), to the vicinity of our microelectrode biosensor. Using this approach, we identified the function of ASC transporters in D-serine uptake and release in the cortex of anesthetized rats, and proposed specific roles for Asc-1 and ASCT2 transporters in the regulation of D-serine levels.

Materials and Methods

D-Serine microelectrode biosensors

D-Serine microelectrode biosensors were prepared as previously described (Pernot et al., 2008, Vasylieva et al., 2011). Briefly, the biosensors employed here consisted of a 25 μm 90% Pt/10% Ir wire (Goodfellow, Huntington, UK), whose tip (50 or 100 μm long, depending on the experiment) extrudes from a pulled glass micropipette. The platinum wire was covered with an electropolymerized layer of poly-*m*-phenylenediamine and a manually-deposited layer of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase (DAAO, EC 1.4.3.3., Pollegioni et al., 1997, Pollegioni et al., 2008), immobilized by cross-linking with poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE) at 55 °C during 2h. This temperature is low enough to preserve the activity of the DAAO enzyme. The biosensors made using PEGDE at 55°C showed a better sensitivity than those prepared using glutaraldehyde, indicating that denaturation, if present at all, is not a major problem for the functioning of the biosensors (Vasylieva et al., 2011).

In vivo experiments

All *in vivo* experiments were performed on male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) weighing 250–350 g. Experimental protocols were approved by the local committee on animals in research at the University Claude Bernard Lyon I (protocol BH2010-19), and were performed in accordance with European directive 86/609/CEE. Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of urethane (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France, 1.5–2 g/kg) and were immobilized in a stereotactic apparatus (Stoelting Corporation, Wood Dale, IL). Body temperature was maintained at 37 °C using a homeothermic blanket (*LSI Letica*, Barcelona, Spain). An Ag/AgCl reference electrode was placed on top of the skull and regularly wetted with PBS to maintain electrical contact. Biosensors were implanted in the frontal cortex (Anteroposterior +3 mm from Bregma, lateral +1 mm, depth +1.5 mm). Amperometric recordings, at a potential fixed at 500mV vs Ag/AgCl, began between 60 and 90 min after implantation, when the electrochemical current recorded by the biosensor had stabilized. To estimate *in vivo* extracellular D-serine concentrations, the oxidation current recorded *in vivo* was divided by the sensitivity of the biosensor in standard solutions at the conclusion of the experiment and corrected for temperature.

D-Serine microinjections in vitro.

For D-serine administration by microionophoresis *in vitro*, a 50- μm long D-serine microelectrode biosensor was inserted into a gel made from 0.3% agar diluted in 10 mM PBS. An ionophoresis pipette, with a tip diameter of ~ 5 μm and filled with 1 M D-serine diluted in Ringer's solution (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂) was placed at 150–800 μm from the tip of the D-serine sensor. Following a stabilization period of 10–20 min ionophoretic injections of D-serine were performed during 5–100 s at currents of 200–1000 nA with a MVCS-02C ionophoresis amplifier (NPI electronics, Tamm, Germany).

D-Serine microinjections in vivo.

For D-serine administration by microiontophoresis *in vivo*, a 100- μm long D-serine microelectrode biosensor was inserted into the frontal cortex of anesthetized rats. An iontophoresis pipette, with a tip diameter of $\sim 5\ \mu\text{m}$ and filled with 1 M D-serine dissolved in Ringer's solution was placed at 150–800 μm from the tip of the D-serine sensor. Following a stabilization period of 60–90 min, iontophoretic injections of D-serine were performed during 5–100 s at currents of 200–1000 nA with a MVCS-02C iontophoresis amplifier (NPI electronics, Tamm, Germany). The distance between the iontophoretic pipette and the biosensor was determined at the end of the experiment, after removing the rat from the stereotactic apparatus, by placing the biosensor and the pipette at the same coordinates as *in vivo* and measuring the distance with a stereomicroscope. No blank biosensor was used to control the specificity of the D-serine signal because the signal was always time-locked with the D-serine injection. Moreover, D-serine injection experiments have been performed and controlled with blank biosensors by (Pernot et al., 2012).

For TTX (citrate salt, Tocris, Bristol, UK) pressure microinjections, a micropipette was implanted at a distance of 150–300 μm from the biosensor. TTX was ejected continuously using constant pressure between 12 and 20 psi delivered by a PV820 pneumatic picopump (WPI, Stevenage, UK).

Reverse microdialysis

The infusion of L-amino acids or SMLC (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was performed by reverse microdialysis. An Elite 12 microdialysis probe (2-mm long and 0.5-mm diameter, CMA Microdialysis, Solna, Sweden) was inserted into the brain, near the tip (0.3–1 mm) of the biosensor. Ringer's solution was circulated in the probe at the speed of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ by an infusion dual syringe pump (Harvard apparatus), linked to a CMA 110 liquid switch (CMA microdialysis) allowing rapid changes of the perfusion solution from control Ringer's to a 100 mM L-amino acid solution or a 1 mM SMLC solution.

Recordings

For amperometric recordings, we used a VA-10 electrochemistry amplifier (NPI electronics, Tamm, Germany) with a two electrode potentiostat (500 M Ω feedback resistor). Data acquisition was performed using an ITC-18 acquisition board (Instrutech, Port Washington, NY) driven with homemade software based on Igor Pro 6.0 procedures (Wavemetrics, Eugene, OR). The oxidation current was sampled at 1000 Hz with a 20 Hz low-pass filter and averaged over 1000 points, yielding a final sampling frequency of 1 Hz. The applied potential is 500mV vs Ag/AgCl.

Analysis of uptake experiments, statistics

Analysis of the uptake experiments was performed with the Igor Pro 6.0 software package. The fit of the injection/uptake curves was performed using the fitting tool of the software. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between two data groups were performed using two-tailed Student's *t* test for equal or unequal variances, as determined by the F test (significance level of $p < 0.05$). For statistical comparisons of three or more data groups, we used an ANOVA followed by Fisher's LSD post-hoc test. The analysis tool-pack of Igor Pro 6.0 and SPSS 12.0 for Windows were used for the statistical analyses.

Results and discussion

To obtain direct *in vivo* information on the rapid dynamics of D-serine release and clearance, we used a specific D-serine biosensor made with DAAO purified from yeast. This biosensor minimizes potential tissue lesions and preserves the integrity of the blood-brain barrier (Pernot et al., 2008, Pernot et al., 2012). The DAAO enzyme (it preferentially oxidizes neutral D-amino acids like D-alanine, D-proline, or D-serine, Pollegioni et al., 1992b), but the DAAO-based microelectrode biosensors are selective for D-serine in the CNS *in vivo*, as it is highly enriched in D-serine compared to other neutral D-amino acids (Hamase et al., 2005). We have previously demonstrated a negligible difference (6%) between D-serine concentrations estimated by our biosensors and those measured using HPLC in rat brain homogenates (Pernot et al., 2008). Finally, D-serine electrochemical signals are undetectable in the cerebellum, a brain structure known to be devoid of D-serine in adulthood (Schell et al., 1997, Williams et al., 2006), further confirming the specificity of our measurements (Pernot et al., 2012).

Identification of a D-serine uptake mechanism in vivo

To study the uptake of D-serine *in vivo*, we used a theoretical model designed to study the diffusion of neurotransmitters in the brain (Rice and Nicholson, 1995). The experimental paradigm consists of releasing a molecule within the brain parenchyma and detecting its diffusion with a biosensor placed at a small distance from the release point. The detected concentration profile is then fitted with a mathematical equation that takes into account diffusion, the tortuosity of the extracellular space, and uptake. In the current study, we used an ionophoretic source to release D-serine and measured its concentration with a D-serine microelectrode biosensor placed a few hundred micrometers away from the pipette (**Fig. 1A**). D-Serine is a neutral molecule at physiological pH and can be ejected using the electro-osmotic flow created by the applied potential in the microionophoresis pipette (Pikal, 1992, Sieg et al., 2008). Following this protocol, the microelectrode biosensor detected an increase in D-serine oxidation current followed by a return to baseline. This pattern was reproducible over multiple injections (**Fig. 1A**). In such conditions, the concentration of D-serine, at a

distance r from the releasing point can be described with the equation (Nicholson and Sykova, 1998):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{\lambda^2} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) + \frac{Q}{\alpha} - k' C \quad (1)$$

where D is the diffusion coefficient of D-serine, λ is the tortuosity, and α is the extracellular fraction of the brain (i.e. the ratio of the volume of the extracellular space by the total volume of the tissue, estimated at 0.2 in the cerebral cortex (Nicholson and Sykova, 1998)). Q is defined as the source term, which describes the release of D-serine during the injection. For ionophoretic ejection of a neutral molecule, Q is directly proportional to the applied current in the glass pipette (Pikal, 1992, Sieg et al., 2004). The last term represents the uptake component which, for simplification, is assumed to be linear with D-serine concentration ($k'C$, where k' is the uptake constant). Under these conditions, this equation has an analytical solution described by the following equation (Nicholson and Sykova, 1998):

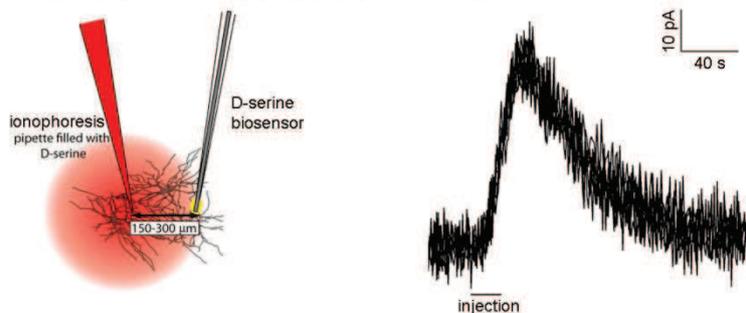
$$C(r,t) = \frac{Q}{8 \pi D^* \alpha r} [h(r, t, \theta) + h(r,t,-\theta)] \quad (2)$$

with $h(r,t,\theta) = [g(r,t,\theta) - g(r,t-T_0,\theta)] \exp(r\theta) \quad (3)$

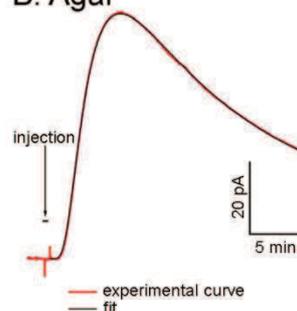
with $g(r,t,\theta) = H(t) \operatorname{erfc} (r/2\sqrt{D^* t} + \theta\sqrt{D^* t}) \quad (4)$

and where T_0 is the duration of the injection, $D^* = D/\lambda^2$ is the apparent diffusion coefficient in the brain (corrected for tortuosity) and $\theta = \sqrt{k'/D^*}$

A. D-serine microinjection *in vivo*



B. Agar



C. *In vivo*

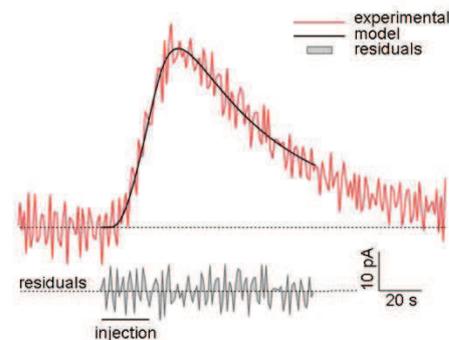


Figure 1: Identification of a D-serine reuptake mechanism in vivo. **A.** Experimental design, in which D-serine is injected by microiontophoresis near a biosensor in the rat frontal cortex. Overlay of six successive D-serine microinjections showing a reproducible D-serine signal detected by the biosensor. **B.** D-Serine clearance in 0.3% agarose can be modeled with free diffusion and almost no uptake. **C.** The kinetics of D-serine clearance *in vivo* reveals an uptake mechanism that limits D-serine lifetime in the extracellular space.

We first validated this model in a gel of 0.3% agar, which has been found to be a good model for the diffusion of molecules in the brain extracellular fluid (Nicholson and Sykova, 1998). In this model, the current recorded at our biosensors increased shortly after the initiation of D-serine iontophoresis, and decayed when the injection was stopped. These experimental curves were then fitted with Equation (2) to yield a computed value of D and k' . In the agar medium, we determined a value of $D = 8.0 \pm 0.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ($n = 15$) that is in good agreement with the chemical constants published in the literature (Zhang et al., 2001), and a very low value of $k' = 1.5 \pm 0.08 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, which reflects the absence of D-serine reuptake in agar (**Fig. 1B**). We then fitted the pattern of D-serine extracellular concentrations following the iontophoretic application of D-serine to the frontal cortex of anesthetized rats with our theoretical model. The distance between the iontophoresis pipette and the biosensor ranged from 150 to 300 μm (as determined at the end of each experiment), and each iontophoretic D-serine injection lasted between 5 and 100 s at 200–1000 nA. For each experiment, we chose a different T_0 because the distance between the pipette and the biosensor varied (sensitivity of the biosensor and number of D-serine molecules ejected by unit of current also varied). When a measurable D-serine signal was detected, T_0 (always between 5 and 100s) was then fixed throughout the experiment and used for modelling the D-serine curve.

We fitted Equation 2 to our amperometric recordings using a set of five coefficients that could be varied during the fitting computation. Initial values had to be provided to the model: the distance between the sensor and the injection pipette (r), and the duration of the injection (T_0) were set equal to their actual experimental values; D^* was set to $3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ which corresponded to $D = 8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (according to our results obtained using 0.3% agar) and $\lambda = 1.6$ (according to tortuosity values determined by Nicholson and Sykova (1998)); θ was set initially at 10^4 , and Q , representing the number of injected D-serine molecules, was set to 10^{11} . This initial value was set empirically, but could vary freely during the fitting process to end with very different values that fitted the experimental curve. The five parameters r , T_0 , D^* , θ and Q were then allowed to vary freely until the fit converged. The fit was estimated to be correct if the residuals were evenly distributed around zero, and if the fitted values of r (distance) and T_0 (duration) stayed within 20% of their real experimental value (**Fig. 1C**).

When D-serine was injected by iontophoresis into the cortex, its concentration near the biosensor increased rapidly, and returned to baseline values much more quickly than did D-serine in our experiments in agar (**Fig. 1A-C**). Basal levels of D-serine could not be determined using the current approach but have been measured around 2.3 μM in the frontal cortex using similar biosensors (Pernot et al., 2012). The fact that the D-serine signal returned

to baseline was a good indication that (1) all of the D-serine that had been injected was cleared from the extracellular space, and (2) that the sensitivity of the biosensor was not affected by the procedure. When we fitted the theoretical equation to our *in vivo* recordings, we obtained an uptake constant of $k' = 0.128 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ ($n=28$), which represents the rate of D-serine uptake in the cortical parenchyma.

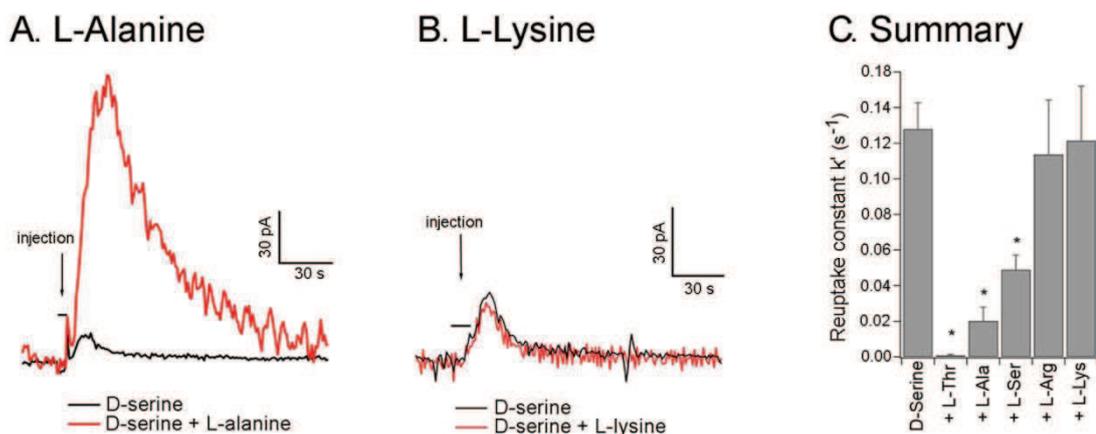


Figure 2: Small neutral amino acids interfere with D-serine reuptake. **A.** Infusion of L-alanine by reverse microdialysis near the biosensor dramatically decreased the efficiency of D-serine reuptake. **B.** L-Lysine infusion did not modify D-serine uptake. **F.** Summary results of the transporter competition experiments using infusion of L-amino acids: D-serine uptake is reduced by the application of L-alanine, L-serine, and L-threonine, but not L-lysine or L-arginine, suggesting that D-serine uptake is mediated by ASC transporters. * : $p < 0.01$.

Small neutral amino acids compete with D-serine uptake

No specific D-serine transporter has been identified so far; however, the Asc and ASCT families of amino acid exchangers can transport D-serine (Rutter et al., 2007, Gliddon et al., 2009). D-Serine is reported to be taken up by non-specific small neutral amino acid transporters of the alanine-serine-cysteine (ASC) family, such as the ASCT2 or Asc-1 transporters (Ribeiro et al., 2002, Helboe et al., 2003, Rutter et al., 2007). To determine the role of ASC transporters in D-serine uptake *in vivo*, we examined D-serine uptake in the presence of interfering small neutral amino acids, which would compete with D-serine for transporter-mediated uptake. This was accomplished by infusing L-threonine, L-alanine, and L-serine near the microelectrode biosensor by reverse dialysis (**Fig. 2A**).

The infusion of L-threonine, L-alanine, and L-serine (100 mM in the microdialysis probe) strongly reduced D-serine uptake (**Fig. 2A**). In presence of these amino acids, D-serine ionophoresis yielded much higher D-serine peak concentrations at the biosensor, and the D-serine decay time increased. The D-serine uptake coefficient (k') was considerably diminished by the presence of the small neutral amino acids, reaching $8.2 \pm 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ in the presence of L-threonine (2.6% of the control value, $n = 6$, $p < 0.01$), $2.0 \pm 0.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ for L-

alanine (10.5% of the control value, $n = 6$, $p < 0.01$), and $4.9 \pm 0.8 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ for L-serine (28 % of the control value, $n = 6$, $p < 0.01$; **Fig. 2C**), indicating that D-serine reuptake was at least partially blocked by these amino acids. It should be noted that L-amino acids are neither substrates nor inhibitors of the DAAO enzyme (Pollegioni et al., 1992a, Pollegioni et al., 2008), and thus do not affect biosensor response (Pernot et al., 2008). We also tested two basic amino acids that are not substrates for the ASCT2 or Asc-1 transporters: L-arginine and L-lysine (Ribeiro et al., 2002, Helboe et al., 2003). These two amino acids did not interfere significantly with D-serine uptake *in vivo* (**Fig. 2B**). The value of the uptake coefficient (k') was $1.1 \pm 0.3 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ in the presence of L-arginine (89% of the control value, $n = 6$, $p = 0.75$), and $1.2 \pm 0.3 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ in the presence of L-lysine (95% of the control value, $n = 6$, $p = 0.9$; **Fig. 2C**). These results indicate that D-serine reuptake *in vivo* is inhibited by competition with small neutral amino acids, suggesting that ASC transporters such as ASCT2 or Asc-1 are involved in D-serine uptake.

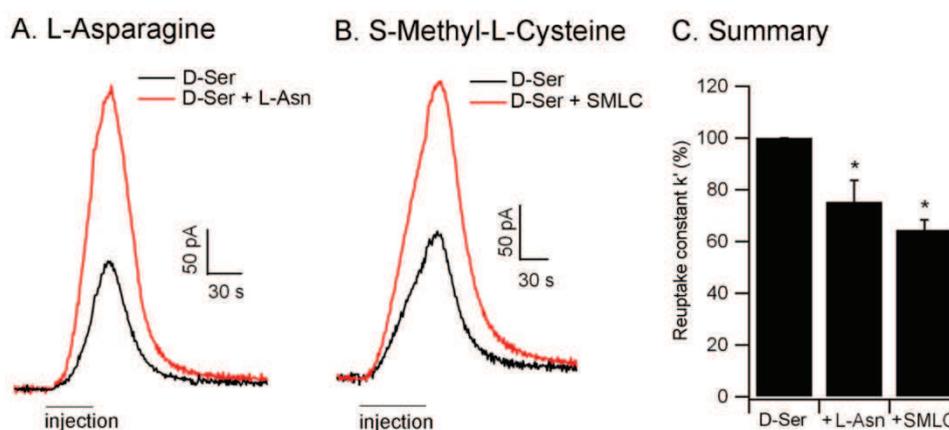


Figure 3: Asc-1 and ASCT2 contribute to D-serine reuptake. **A.** Infusion of L-asparagine, a specific substrate of ASCT2 ($n=6$). **B.** SMLC, a specific Asc-1 inhibitor decreased D-serine reuptake ($n = 6$). **C.** Summary results of D-serine uptake inhibition by L-asparagine or SMLC, implicating both Asc-1 and ASCT2 transporters in D-serine reuptake. The uptake coefficient k' is expressed as the percentage of its value when D-serine alone is injected. * : $p < 0.05$.

Distinguishing Asc-1- and ASCT2-mediated transport using S-methyl-L-cysteine or L-asparagine

Of the Asc family, only the Asc-1 subtype is present in the brain, and is predominantly expressed in neurons. The high affinity of Asc-1 for D-serine ($K_M=20 \mu\text{M}$) (Rutter et al., 2007), has made it the primary candidate for D-serine transport *in vivo* (Ribeiro et al., 2002, O'Brien and Bowser, 2006, Rosenberg et al., 2010). ASCT transporters are Na^+ -dependent, and both ASCT1 and ASCT2 are present in the brain (Gliddon et al., 2009) However, ASCT1 does not appear to transport D-serine (Shafqat et al., 1993). As the affinity of ASCT2 for D-serine is lower than that of Asc-1 (about 1 mM)(Shao et al., 2009), its role in D-serine regulation has been underappreciated. However, in synaptosomes prepared from Asc-1

knockout mice, a residual D-serine uptake could be detected that was likely reliant upon ASCT2 transporters. Therefore, significant D-serine uptake through ASCT2 transporters could not be excluded *a priori*.

To identify the role for each of these subtypes, we infused rat cortex with L-asparagine, a specific substrate of ASCT2 transporters with very low affinity for Asc-1 (Utsunomiya-Tate et al., 1996, Gliddon et al., 2009) and one of the most efficient inhibitors of ASCT2-mediated D-alanine transport (Utsunomiya-Tate et al., 1996, Fukasawa et al., 2000b). We also administered SMLC, an Asc-1 transporter blocker that is inactive on system A transporters or serotonin, norepinephrine, and glutamate reuptake (Thomsen et al., 2003, Ishiwata et al., 2013). Benzyl-serine, another pharmacological compound that blocks ASCT2 transporters (Greuer and Grabsch, 2004), could not be used in this study because it produced a non-specific electrochemical signal that was detected by our biosensor. We found that L-asparagine (100 mM) infused into the vicinity of the D-serine biosensor successfully competed with D-serine. Under these conditions, the D-serine reuptake constant decreased from $5.6 \pm 1.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ to $4.3 \pm 1.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (-24.7%, $n = 6$, $p = 0.011$, **Fig. 3A, C**). Similarly, SMLC (1 mM) infusion reduced the D-serine uptake coefficient from $5.1 \pm 1.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ to $3.3 \pm 1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (-35.6%, $n = 6$, $p = 0.015$, **Fig. 3B, C**). These results therefore indicate that D-serine reuptake *in vivo* is mediated by both ASCT2 and Asc-1.

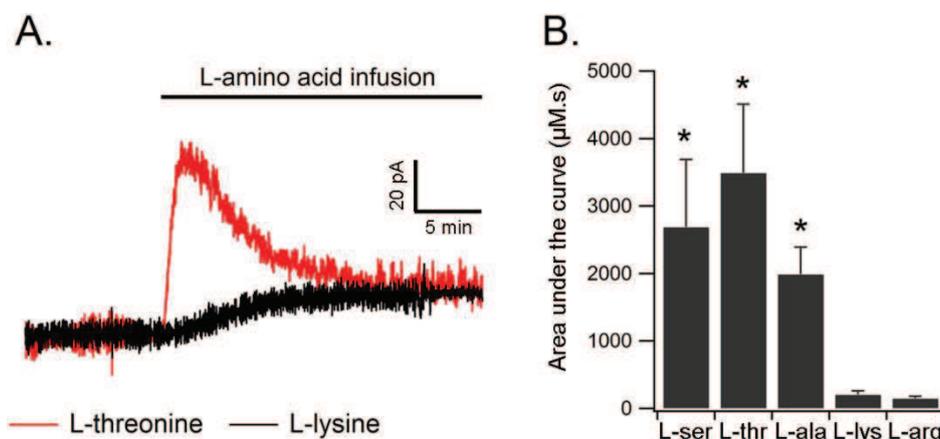


Figure 4. D-Serine release evoked by local infusion of small neutral amino acids. A. L-Threonine infusion near the biosensor evokes an initial transient increase in extracellular D-serine concentrations that lasts approximately 5 min. In contrast, L-lysine infusion produces only a small non-specific shift in the baseline current. **B.** D-Serine release is evoked by the infusion of small neutral amino acids like L-alanine, L-serine and L-threonine, but not by L-lysine or L-arginine. This amino acid profile suggests that D-serine release is mediated by ASC transporters.

Interestingly, 1 mM SMLC infusion did not produce any significant change in D-serine basal level. However, in a recent microdialysis study, Ishiwata et al. detected an increase in extracellular D-serine in response to 1 mM, but not 100 µM SMLC (Ishiwata et al., 2013).

This apparent discrepancy probably results from the fact that our electrochemical recordings were performed at a distance of about 500 μm from the microdialysis probe, at which the effective SMLC concentration was much lower. The fact that SMLC did not change basal D-serine levels at the biosensor suggests that its concentration was probably in the order of 100 μM or below, at which no change in other L-amino acids have been detected (Ishiwata et al., 2013).

D-Serine release evoked by small neutral amino acids

In our reverse dialysis experiments, we rapidly delivered large amounts of L-amino acids into the vicinity of the D-serine microelectrode biosensor. Because ASC transporters are known to mediate amino acid hetero-exchange *in vitro* (Fukasawa et al., 2000b, Ribeiro et al., 2002, Rosenberg et al., 2013), we were interested in determining the effects that increased small neutral amino acid concentrations may have upon extracellular D-serine levels. The infusion of L-alanine, L-threonine, or L-serine into the rat cortex induced a rapid, transient increase in the oxidation current measured by the D-serine microelectrode biosensor. This transient increase in D-serine level was followed by a return to a slightly elevated baseline (**Fig. 4A**). For example, L-threonine infusion induced an increase in the D-serine extracellular concentration peaking at $16 \pm 5 \mu\text{M}$ (**Fig 4A**). By contrast, infusion of basic amino acids such as L-lysine or L-arginine, that are not substrate for ASCT2 or Asc-1 transporters, produced only a small shift in the baseline D-serine oxidation current recorded by the microelectrode biosensor (**Fig. 4B**). There was no difference between the shift in the baseline current at the biosensor after L-arginine or L-lysine infusion and that observed 15-20 min after L-serine, L-alanine or L-threonine infusion (well after the peak in D-serine concentration). Therefore, there was no evidence that the D-serine extracellular concentration remained significantly elevated after its transient increase induced by small neutral amino acids. The slight shift in the baseline electrochemical current was more likely due to a small non-specific oxidation current due to the large amounts of L-amino acids delivered to the tissue.

As L-alanine, L-threonine, and L-serine can compete with D-serine reuptake at the ASCT2 and Asc-1 transporters, it could be argued that the increase in D-serine concentration evoked by infusion of these amino acids may result from an inhibition of D-serine reuptake, followed by D-serine accumulation in the extracellular space. It is unlikely, however, that reuptake blockade alone could explain the kinetics of D-serine concentration changes that we observed. Transporter blockade usually produces a slow, long lasting increase in neurotransmitter levels (see for example Oldenziel et al. (2006) for blockade of glutamate transporters, or Martina et al. (2004) for blockade of glycine transporters), which is not compatible with the biphasic changes produced by the infusion of small neutral amino acids. Here, D-serine release probably occurred through an amino acid hetero-exchange that quickly depleted the intracytoplasmic pool of free D-serine, resulting in a transient increase in D-serine extracellular concentration lasting only a few minutes. The D-serine released locally by hetero-exchange was probably cleared by free diffusion into the brain parenchyma within a few minutes.

We then sought to discriminate the roles of ASCT2 and Asc-1 in D-serine release. By infusing L-asparagine near the biosensor, we tested whether ASCT2 transporters would be specifically challenged to release endogenous D-serine by a hetero-exchange mechanism. However, L-asparagine produced only modest changes in D-serine-mediated oxidation currents that were smaller than those produced by L-alanine, L-threonine, or L-serine, and were not significantly different from the effects of L-arginine or L-lysine, which are not substrates for ASC transporters (area under the curve = $1031.66 \pm 626 \mu\text{M}\cdot\text{s}$ for L-asparagine, 3490.51 ± 1022 for L-threonine, 146.03 ± 35.33 for L-arginine, $n=6$). An ANOVA followed by an LSD post-hoc test revealed a significant difference between these amino acids ($F(2,17) = 5.62$, $p=0.013$) with a significant difference between L-threonine and L-asparagine ($p=0.02$) but not between L-asparagine and L-arginine ($p=0.34$). This result indicates that L-asparagine, that specifically triggers amino acid hetero-exchange through ASCT2 transporters does not induce significant D-serine release. In separate experiments, we tested the ability of L-serine to induce D-serine release in the presence of the Asc-1 blocker SMLC. We again detected small deflections in D-serine-mediated oxidation currents that were significantly smaller than those produced by L-serine alone (2689.44 ± 1002.41 for L-serine, $382.43 \pm 170.38 \mu\text{M}\cdot\text{s}$ for L-serine + SMLC, 146.03 ± 35.33 for arginine, $n=6$). ANOVA followed by LSD post-hoc test ($F(2,17) = 3.624$, $p=0.048$) indicated that L-serine in the presence of SMLC was significantly different from L-serine alone ($p=0.048$) but not from L-arginine ($p=0.83$, **Fig. 5C, D**). These data demonstrate that D-serine release was impaired when Asc-1 transporters were blocked by SMLC.

D-Serine release therefore appeared to be mediated by Asc-1 but not ASCT2 transporters. The implication of ASCT2 transporters in D-serine uptake but not release is supported by their predominant localization in astrocytes (see however Gliddon et al. (2009)), which possess high intracellular L-glutamine and L-serine concentration. Therefore, as ASCT2 transporters have a much higher affinity for L-glutamine and L-serine, they should preferentially release these molecules when challenged by extracellular small neutral amino acids (Broer et al., 1999, Yang et al., 2010b, Wolosker, 2011). Previous work has shown that astrocytes likely release D-serine through other pathways, such as volume-regulated anion channels or exocytosis (Mothet et al., 2005, Rosenberg et al., 2010, Martineau et al., 2013).

Effects of neuronal silencing by tetrodotoxin (TTX) on D-serine extracellular concentration

We then determined whether such hetero-exchange mechanisms could be engaged during more physiological functioning of the CNS. In this regard, several studies have reported that D-serine levels can be modified by changes in neuronal activity (Hashimoto et al., 2000, Mustafa et al., 2004, Kim et al., 2005, O'Brien and Bowser, 2006, Mustafa et al., 2007, Henneberger et al., 2010). In the current experiments, we were unable to observe any obvious change in D-serine level in response to electrical stimulation in the cortex or in the hippocampus (data not shown). However, we clearly detected an increase in D-serine levels in response to the blockade of action potentials with TTX ($+ 10.7 \pm 5 \%$ in D-serine oxidation current, $n = 6$, $p = 0.04$, **Fig. 6A**). Local field potentials (LFPs) were apparent on the raw

amperometric trace, before we averaged the signal to measure oxidation currents (Zhang et al., 2009, Viggiano et al., 2012). LFPs rapidly diminished following TTX microinjection (100 μM), confirming a decrease in neuronal activity around the biosensor. This effect was accompanied by a slow increase in the D-serine signal. This increase was not detected by control biosensors (**Fig. 6A**), and corresponded to an elevation of extracellular D-serine levels of $0.4 \pm 0.09 \mu\text{M}$. This effect is consistent with a previous study by Hashimoto et al (1995a). Given that NMDA receptor activation can trigger nitric oxide (NO) release that inhibits SR (Mustafa et al., 2007), it is possible that TTX, by blocking neuronal transmission and NMDA receptor activation might have relieved this block and induced an increase in D-serine synthesis and release at least in part through this pathway.

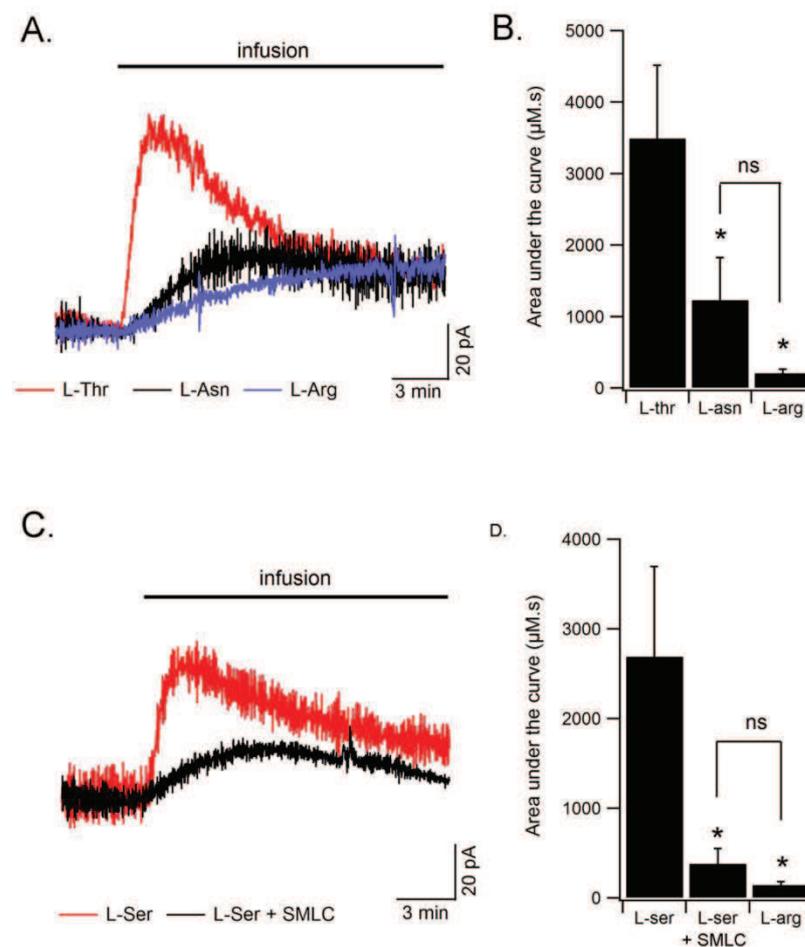


Figure 5. Asc-1 but not ASCT2 contribute to D-serine release. **A.** L-threonine infusion near the biosensor produced a transient increase in D-serine extracellular concentration that was much larger than that produced by L-asparagine or L-arginine. **B.** Summary results of the overall amount of released D-serine (area under the curve in $\mu\text{M}\cdot\text{s}$) by L-threonine, L-asparagine or L-arginine ($n = 9$). **C.** SMLC significantly decreases D-serine release evoked by L-serine ($n = 6$). **D.** Summary results of the overall amount of D-serine detected by the biosensor in response to the infusion of L-serine, L-serine in the presence of SMLC or L-arginine. A significant proportion of D-serine is released through Asc-1 transporters.

To determine the involvement of ASC transporters in the TTX-induced increase in D-serine, we injected rats systemically with a large dose of L-serine or L-lysine (1 g/kg i.p.). We reasoned that, as these amino acids cross the blood brain barrier, these systemic injections would raise the intracerebral concentrations of L-serine or L-lysine. Elevated L-serine (but not L-lysine) levels would thus interfere with the normal functioning of ASC transporters. In preliminary experiments, we quantified L-serine levels in rat brain homogenates using HPLC and determined that, 1 hr following L-serine administration (1 g/kg i.p.), the intracerebral level of L-serine had more than doubled (441 ± 26 pmol/mg wet tissue in control animals, 1225 ± 276 pmol/mg 1 h after L-serine injection, $n = 6$, $p = 0.036$), confirming an earlier report by Pernot et al. (2012). When TTX was applied *in vivo* in L-serine injected rats, the increase in D-serine level was completely blocked. The D-serine signal remained stable or slightly decreased, similar to control recordings (-1.3 ± 1 pA, $n=6$, $p < 0.01$, **Fig. 6B, C**). However, after L-lysine injection, TTX produced an increase in the D-serine signal ($+ 4.7 \pm 1$ pA, $n=6$, **Fig. 6B, C**) of similar amplitude to that produced by TTX alone ($+ 4.3 \pm 2.1$ pA). These results indicate that the effects of TTX on D-serine extracellular concentration are blocked via competition by small neutral amino acids, suggesting an involvement of ASC transporters in activity-dependent changes in D-serine levels.

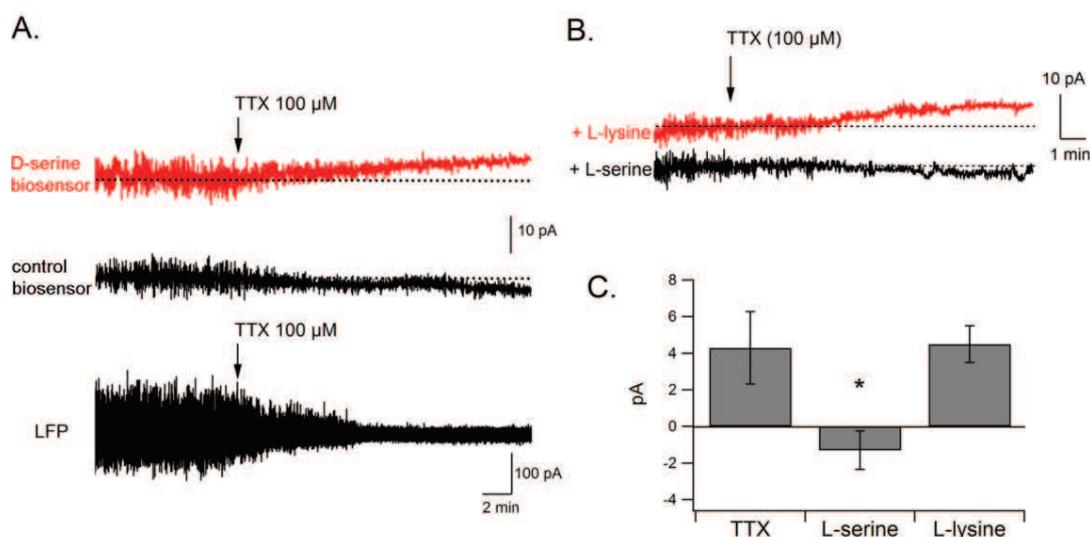


Figure 6. TTX increases D-serine concentration via an ASC transporter-dependent mechanism. **A.** TTX microinjection near the biosensor causes a progressive block of neuronal activity, evidenced by the disappearance of local field potentials, together with an increase in D-serine extracellular concentration. TTX administered near a control biosensor does not produce any noticeable change in oxidation current. **B.** Systemic administration of L-serine, but not L-lysine, (1 g/kg i.p.) inhibits the effect of TTX on D-serine levels, suggesting the involvement of ASC transporters in this process. **C.** Summary results showing a significant inhibition of the TTX effect by L-serine.

D-Serine release: heteroexchange versus exocytosis

In addition to transporter-mediated D-serine release, some studies using astrocyte cultures have suggested that D-serine may also be released via Ca^{2+} -dependent exocytosis (Mothet et al., 2005, Martineau et al., 2008, Martineau et al., 2013). By analyzing synaptic currents in hippocampal slices, Henneberger et al. (Henneberger et al., 2010) also suggested that D-serine release could be exocytotic. In contrast, a recent study found that D-serine can be released by neurons in primary culture and acute brain slices, and that this release is essentially Ca^{2+} -insensitive, which is incompatible with exocytosis (Rosenberg et al., 2010). In addition, neuronal D-serine release evoked by hetero-exchange with exogenous D-isoleucine can modulate long-term potentiation in hippocampal slices (Rosenberg et al., 2013). Although our results clearly implicate ASC transporters in extracellular D-serine regulation, we cannot rule out the possibility of an alternative exocytotic release pathway. Exocytotic D-serine release could potentially be specific to the synaptic cleft, and therefore not detectable by our microelectrode biosensors, which sample the extrasynaptic compartment. D-Serine stores have been identified in intracellular organelles present in astrocytes (Williams et al., 2006, Martineau et al., 2008), and represent more than 99% of total D-serine present in the brain (Pernot et al., 2012). In our experimental conditions, electrical stimulation did not produce detectable D-serine release in the extrasynaptic space, suggesting that if D-serine was released in response to neuronal stimulation, it would not significantly diffuse outside the synaptic cleft. Therefore, it is possible that D-serine is differentially regulated by heteroexchange vs. exocytosis in the extra- and intrasynaptic compartments, respectively. These two mechanisms could thus mediate different kinetics of D-serine fluctuation, whereby fast increases rely on exocytosis, and slower bidirectional adaptations might require mechanisms of hetero-exchange.

Up to now, the identification of D-serine exocytosis has been almost exclusively restricted to astrocytes and Bergman glia (Mothet et al., 2005, Henneberger et al., 2010, Kakegawa et al., 2011, Martineau et al., 2013), whereas Asc-1 transporters susceptible to release D-serine are preferentially neuronal. It is therefore possible that exocytosis and hetero-exchange are D-serine release mechanisms utilized by glial cells and neurons, respectively. In support of this concept, an interesting model suggesting the existence of a serine shuttle between astrocytes and neurons has recently been proposed (Wolosker, 2011). Because SR expression is predominantly neuronal, D-serine synthesis would occur primarily in neurons, from which it would be released into the extracellular space to be taken up and stored in astrocytes. Our current study provides *in vivo* evidence that supports this model by placing Asc-1 and ASCT2 transporters in key positions to mediate such serine shuttle (Fig. 7).

Conclusion

The present results indicate that ASC transporters are important players in the regulation of extracellular D-serine concentrations *in vivo* by mediating both D-serine release and uptake. As D-serine is a potential new target for therapeutic intervention in schizophrenia, amyotrophic lateral sclerosis, and ischemia, it is likely that such hetero-exchange mechanisms

will need to be taken into account in the development of new drugs targeting NMDA receptor activity. In particular, the development of specific inhibitors of Asc-1 or ASCT2 transporters administered alone, or in combination with exogenous D-serine, appears to be a promising avenue for the pharmacological modulation of D-serine levels in the brain.

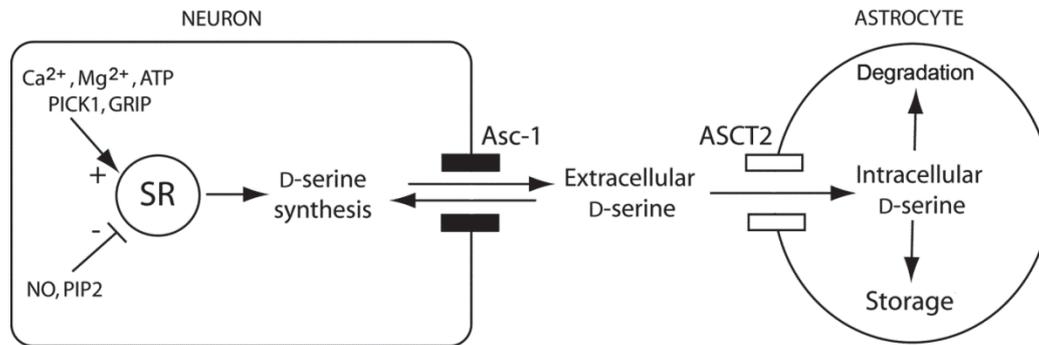


Figure 7: Schematic representation of D-serine transport mechanisms through Asc-1 and ASCT2 transporters. D-Serine is synthesized in neurons by SR, an enzyme whose activity can be up- or downregulated by multiple cofactors. Newly synthesized D-serine is rapidly released into the extracellular space via Asc-1 transporters, before reuptake by neurons via Asc-1, or by astrocytes, via ASCT2. D-Serine transported into astrocytes could be stored for subsequent release (forebrain) or degraded by endogenous DAAO (cerebellum). ATP: adenosine triphosphate; PICK1: protein interacting with C Kinase 1; GRIP: glutamate receptor interacting protein; NO: nitric oxide; PIP2: phosphatidylinositol biphosphate.

Acknowledgements: This study was supported by Inserm U1028, Université Claude Bernard Lyon I, and by grants from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0063 Neurosense) to SM. LP thanks the financial support of from Fondo di Ateneo per la Ricerca. PP, CM and NV are recipients of PhD fellowships from Ministère de la Recherche. We are grateful to Dr. Alison Mungenast for helpful comments on an earlier version of the manuscript. We thank Aïcha Compard and Animalerie Rockefeller (SCAR) for animal care. The Lyon Neuroscience Research Center is part of SFR Santé Lyon Est (UCBL, UMS 3453 CNRS, US7 Inserm). The authors have no conflict of interest to declare.

Chapitre 3

In vivo degradation of D-serine in the Central Nervous System depends on D-Amino Acid Oxidase and serine racemase

Dans ce chapitre, nous avons étudié le rôle de la sérine racémase et de la D-amino acide oxydase dans la dégradation de la D-sérine *in vivo*. Nous avons démontré que la sérine racémase est responsable de la dégradation de la D-sérine dans le cortex tandis que la DAAO la dégrade dans le cervelet.

In vivo degradation of D-serine in the Central Nervous System depends on D-Amino Acid Oxidase and serine racemase

Caroline MAUCLER^{1,2}, Pierre PERNOT¹, Natalia VASYLIEVA^{1,3}, Loredano POLLEGIONI⁴
and Stéphane MARINESCO^{1,2,*}

¹INSERM U1028; CNRS UMR5292 Lyon Neuroscience Research Center, AniRA-Neurochem technological platform, team WAKING, Lyon, F-69000, France.

²Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, F-69000, France.

³Institut de nanotechnologie de Lyon, CNRS UMR-5270, INSA de Lyon, France.

⁴Dipartimento di Biotecnologie e Scienze Molecolari, Università degli studi dell'Insubria, Varese, and Centro Interuniversitario di Ricerca in Biotecnologie Proteiche "The Protein Factory", Politecnico di Milano and Università degli studi dell'Insubria, Italy

* corresponding author: Stéphane Marinesco, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Team WAKING, Université Claude Bernard Lyon I, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France.

Tel : +33 (0)4 78777041, Fax : +33 (0)4 78777150, Email: stephane.marinesco@univ-lyon1.fr

Abstract:

D-serine is a transmitter acting as a co-agonist of N-methyl D aspartate (NMDA) receptors. It has been implicated in neurological and psychiatric disorders such as ischemia, Alzheimer's disease or schizophrenia. However the biochemical mechanisms responsible for D-serine degradation in the central nervous system (CNS) are still poorly understood. The enzyme D-Amino Acid Oxidase (DAAO) catalyzes D-serine oxidation into hydroxypyruvate, but is only expressed in the hindbrain in adulthood. In addition, serine racemase (SR), an enzyme expressed in the forebrain that synthesizes D-serine through L-Serine racemization, can also catalyze D-serine α,β -elimination into hydroxypyruvate *in vitro*. The activity of these enzymes, however, has never been investigated *in vivo*. In this study, we investigated the effect of DAAO and SR inhibition on D-serine extracellular levels in cerebellum and cortex of adult male rats, using enzymatic microelectrode biosensors. In basal conditions, D-serine extracellular level was undetectable (below 0.5 μM) in the cerebellum, and about 1.3 μM in the cortex. Three hours after an intraperitoneal injection of D-serine (1g/kg), D-serine extracellular concentration slowly increased by $0.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ in the cerebellum and $1.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$ in the cortex. DAAO inhibition by intraperitoneal benzoate administration (2000 mg/kg) did not change D-serine basal levels in cerebellum and cortex. However, it dramatically increased D-serine penetration in the cerebellum after intraperitoneal D-serine injection (D-serine extracellular levels increased by $3.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$). By contrast, DAAO inhibition had no effect in the cortex. Conversely, SR was inhibited by intracerebroventricular injection of 0.5 μmol of Phenazine Ethosulfate (Et-phen). However, it facilitated D-serine penetration into the cortex (+50 % saline + D-serine, +143% Et-phen + D-serine), but not in the cerebellum. These results indicate that after systemic D-serine administration, most of D-serine crossing the blood-brain barrier is degraded by DAAO in the cerebellum and by SR in the cortex. The D-serine degradation mechanisms that are identified here can be the target of new pharmacological molecules aimed at modulating D-serine levels for treating diseases such as schizophrenia.

Keywords: microelectrode biosensor, electrochemical detection, amperometry, rat.

Introduction:

D-serine is the main D-amino acid present in the mammalian central nervous system. D-serine is a transmitter that potentiates the action of glutamate on N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors by binding to the co-agonist site by competition with glycine on the NR1 subunit (Mothet et al., 2000a). It plays a major role in activity-dependent neuronal plasticity such as long-term potentiation or depression (Zhang et al., 2008, Henneberger et al., 2010) and in brain development (Schell et al., 1997). It has also been implicated in several psychiatric and neurological disorders such as schizophrenia (Bendikov et al., 2007), amyotrophic lateral sclerosis (Sasabe et al., 2007) and Alzheimer disease (Wu et al., 2007, Inoue et al., 2008). The enzyme D-Amino Acid Oxidase (DAAO) catalyzes D-serine oxidation into hydroxypyruvate. DAAO is mostly expressed in the kidney, liver and brain where its activity is detected principally in the cerebellum, medulla and pons in adulthood (Moreno et al., 1999, Loss et al., 2012). In addition, serine racemase (SR), a pyridoxal 5' phosphate (PLP), enzyme expressed in the forebrain (Miya et al., 2008) that synthesizes D-serine through L-Serine racemization, can also catalyze D-serine α,β -elimination into hydroxypyruvate *in vitro* (Wolosker and Mori, 2012).

Dysregulations in DAAO activity, resulting in a decrease or an increase in D-serine degradation, has been implicated in several neurological and psychiatric pathologies. DAAO has been associated to the familial form of the amyotrophic lateral sclerosis (Mitchell et al., 2010). $B_6\text{Dao}^{-/-}$ KO mice that are deficient for DAAO show motoneuron neurodegeneration (Sasabe et al., 2012). By contrast, in schizophrenia, an increase in DAAO activity is present in the cortex (Madeira et al., 2008) and in the cerebellum (Burnet et al., 2008). Furthermore, mutations in the G72 gene on chromosome 13q have been associated with schizophrenia, and the G72 (gene product) protein interacts physically with DAAO (Chumakov et al., 2002, Sacchi et al., 2008). In consideration of these findings, it is likely that a reduction in brain D-serine levels play a role in the pathophysiology of schizophrenia. In order to compensate for this deficit, a therapeutic strategy based on the oral administration of D-serine has been proposed. However, the results obtained in patient are contrasted: some studies showed a significant reduction of positive, negative and cognitive symptoms (Tsai et al., 1998, Heresco-Levy et al., 2005, Kantrowitz et al., 2010) whereas others showed no significant improvements (Tsai et al., 1999, Lane et al., 2005, Lane et al., 2010, Weiser et al., 2012).

Improving our understanding of the mechanisms of D-serine degradation in the CNS appears essential to better understand these pathologies and design new treatments targeting D-serine. In this study, we developed an *ex vivo* assay to evidence DAAO or SR activity in brain homogenates. We then investigated the role of DAAO and SR in D-serine degradation using a D-serine biosensor that we recently developed (Pernot et al., 2008). We determined the effects of SR inhibition or DAAO inhibition both on D-serine resting levels and on the increase in D-serine extracellular concentration in response to a D-serine intraperitoneal injection.

Materials and methods:

Microelectrode biosensor recordings

D-Serine microelectrode biosensors were prepared as previously described (Pernot et al., 2008, Vasylieva et al., 2011). Briefly, the biosensors consisted of a 25 μm 90% Pt/10% Ir wire (Goodfellow, Huntington, UK) with a tip that protruded from a pulled glass micropipette by 100 μm . The platinum wire was coated with an electropolymerized layer of poly-m-phenylenediamine (PPD) and a manually-deposited layer of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase (DAAO, EC 1.4.3.3., Pollegioni et al., 1997, Pollegioni et al., 2008), immobilized by cross-linking with glutaraldehyde (Pernot et al., 2008) or poly (ethylene glycol) diglycidyl ether (Vasylieva et al., 2011). Amperometric recordings were performed using a VA-10 electrochemistry amplifier (NPI electronics, Tamm, Germany) with a two-electrode potentiostat (500 M Ω feedback resistor) connected to an ITC-18 acquisition board (Instrutech, Port Washington, NY) and controlled by homemade software based on Igor Pro 6.0 procedures (Wavemetrics, Eugene, OR). The holding potential for amperometric recordings was set to 500 mV versus Ag/AgCl, and the oxidation current was sampled at 1 kHz with a 20 Hz low-pass filter and averaged over 1000 points, yielding a final sampling frequency of 1 Hz. Biosensors were calibrated for D-serine and serotonin (5-HT) detection in phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4) before and after *in vivo* recordings. If the biosensor sensitivity diminished by more than 25% during the course of the *in vivo* recording, or if the PPD screening layer lost its efficacy (more than 1 pA/10 μM 5-HT detected), data from that experiment were discarded. This happened in about 5-10% of the experiments. Control sensors were prepared according to the same protocol as D-serine sensors, except that the RgDAAO layer was replaced by a BSA layer.

In vivo experiments

In vivo experiments were performed on male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) weighing 150–350 g. All experimental protocols were approved by the local committee on animals in research at the University Claude Bernard Lyon I and were performed in accordance with European directive 86/609/CEE. Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of urethane (Sigma, 1.5-2g/kg), and were then immobilized in a stereotactic apparatus (Stoelting Corporation, Wood Dale IL). Their body temperature was maintained to 37°C using a homeothermic blanket (*LSI Letica*, Barcelona, Spain). An Ag/AgCl reference electrode was placed on top of the skull and regularly wetted with PBS to maintain electrical contact. Biosensors were implanted in the frontal cortex (all coordinates in mm from Bregma: 3.0 AP, \pm 1.0 ML, -1.5 DV), in the cerebellum (AP -11.3 mm, ML +1 mm, DV -1.5 mm). After 1-2h of stabilization of the baseline currents, 1g/kg D-serine was injected intraperitoneally. For the experiments using benzoate, 2000 mg/kg sodium benzoate (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was first injected intraperitoneally and 1g/kg D-serine was injected 1 h after the sodium benzoate injection. For the experiment using phenazine

ethosulfate (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), the injection are made in the lateral ventricle (AP -0.9 mm, ML \pm 1.5mm, DV -3.0mm). 30 minutes before the injection of 1 g/kg D-serine.

D-amino acid oxidase activity assay

The activity tests of rat brain DAAO were made in amperometry, on cerebellum homogenates. Briefly rat brains were collected after decapitation under urethane anesthesia, and the cerebellum were separated and weighed. They were then mechanically dissociated at 4°C in 3 ml of 10 mM PBS pH 8.5 containing a protease inhibitor cocktail (PIC, Sigma), and sonicated. The tests were performed in a solution of PBS pH 8.5 containing the cerebellum homogenate diluted 10 times, 10 mM FAD and 10 mM NaN₃, and 0 to 100 mM benzoate. The DAAO activity was determined by the slope of the current increase measured by a platinum electrode capable of detecting H₂O₂, composed with a platinum wire and PPD layer, without enzyme after the addition of D-serine in the measurement medium.

The activity test of RgDAAO fixed on the biosensor was determined by a D-serine calibration of the D-serine microbiosensor in PBS pH 8.5, in presence of 0 to 1 mM benzoate.

Serine racemase activity assay

SR activity was assayed in rat forebrain homogenates using amperometric detection of H₂O₂ production. The forebrain is removed from the skull and prepared as previously described for the cerebellum. Briefly rat brains were collected after decapitation under urethane anesthesia, and the forebrain is separated and weighed. For Et-phen inhibition condition, forebrain is removed 1h after intracerebroventricular injection of Et-phen. They were then mechanically dissociated in 5 ml of 10 mM PBS pH 8.5 containing 0.1 % of a protease inhibitor cocktail (PIC, Sigma) at 4 °C, and sonicated. The tests were performed in a solution of PBS pH 8.5 at 37°C containing the forebrain extract, PLP (10 mM), ATP (10 mM), MgCl₂ (100 mM).

Statistics

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between two data groups were performed using the Student's t test for equal or unequal variances, as determined by the F test (significance level was $p < 0.05$). For statistical comparisons of three or more data groups, we used an ANOVA followed by Bonferroni LSD post-hoc test. The analysis tool-pack of Igor Pro 6.0 and SPSS 20.0 for Windows were used for the statistical analyses.

Results:

Ex vivo DAAO assay

We tested DAAO activity in cerebellum homogenates *ex vivo*. To evaluate DAAO activity, we measured the production of H₂O₂ in cerebellum homogenates after an injection of D-serine. For this purpose, we used a platinum electrode capable of detecting H₂O₂. When we injected 100 mM of D-serine in the homogenate and we recorded a linear increase in H₂O₂ concentration of 55.5 ± 5.2 pmol/mg wet tissue/min (Fig. 1). To inhibit DAAO, we added sodium Benzoate (NaBenzoate), a specific DAAO inhibitor. We should note that the D-serine biosensor uses the yeast DAAO isoform (RgDAAO) that is different from mammalian (rat) DAAO in its sensitivity to NaBenzoate (Frattini et al., 2011). When we tested sodium benzoate inhibition on these two enzymes, we determined that the IC₅₀ of NaBenzoate was 6.5 μ M for rat DAAO while it was 3.2 mM for the D-serine biosensor (Fig 2). Therefore, it was possible to inhibit the rat DAAO present in our brain homogenates while leaving the sensitivity of our biosensors unchanged. When we added 0.5 mM of NaBenzoate in the homogenate, it totally blocked H₂O₂ production (0.24 ± 1.74 pmoles/mg cerebellum/min). In parallel experiments, we tested forebrain homogenates, but DAAO activity was undetectable. These results indicate that DAAO activity can be detected in cerebellum but not forebrain homogenates.

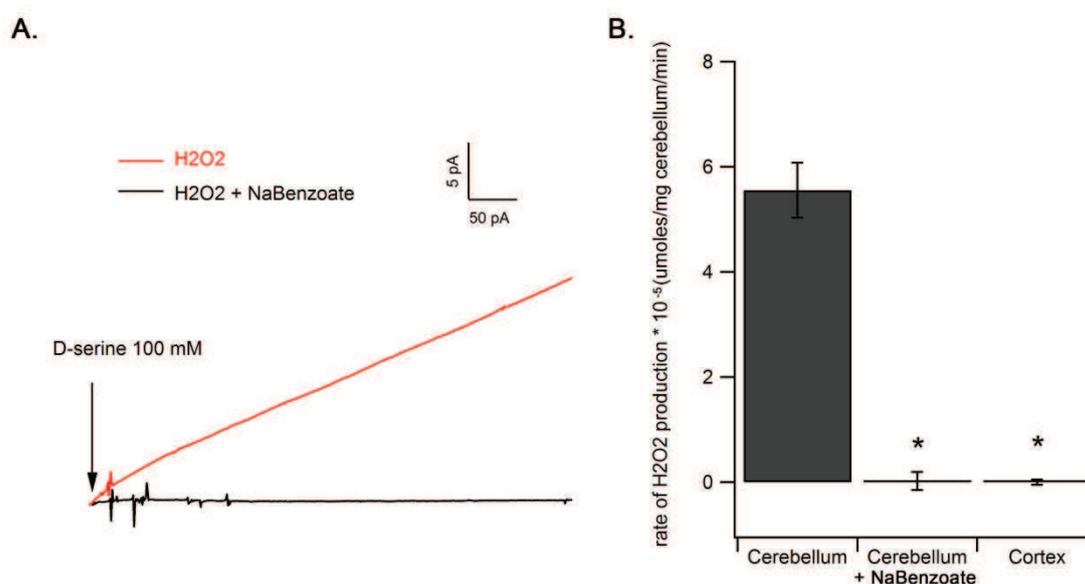


Figure 1: An *ex vivo* assay for DAAO activity

- A. Detection of DAAO activity by H₂O₂ production in cerebellum homogenate after an injection of 100 mM D-serine in presence or absence of NaBenzoate (n=5) and in forebrain homogenate (n=6).
- B. Mean \pm SEM values of H₂O₂ production in cerebellum homogenate after an injection of 100 mM D-serine in presence or absence of NaBenzoate. *p < 0.01 relative to basal level (ANOVA with Bonferroni post-hoc).

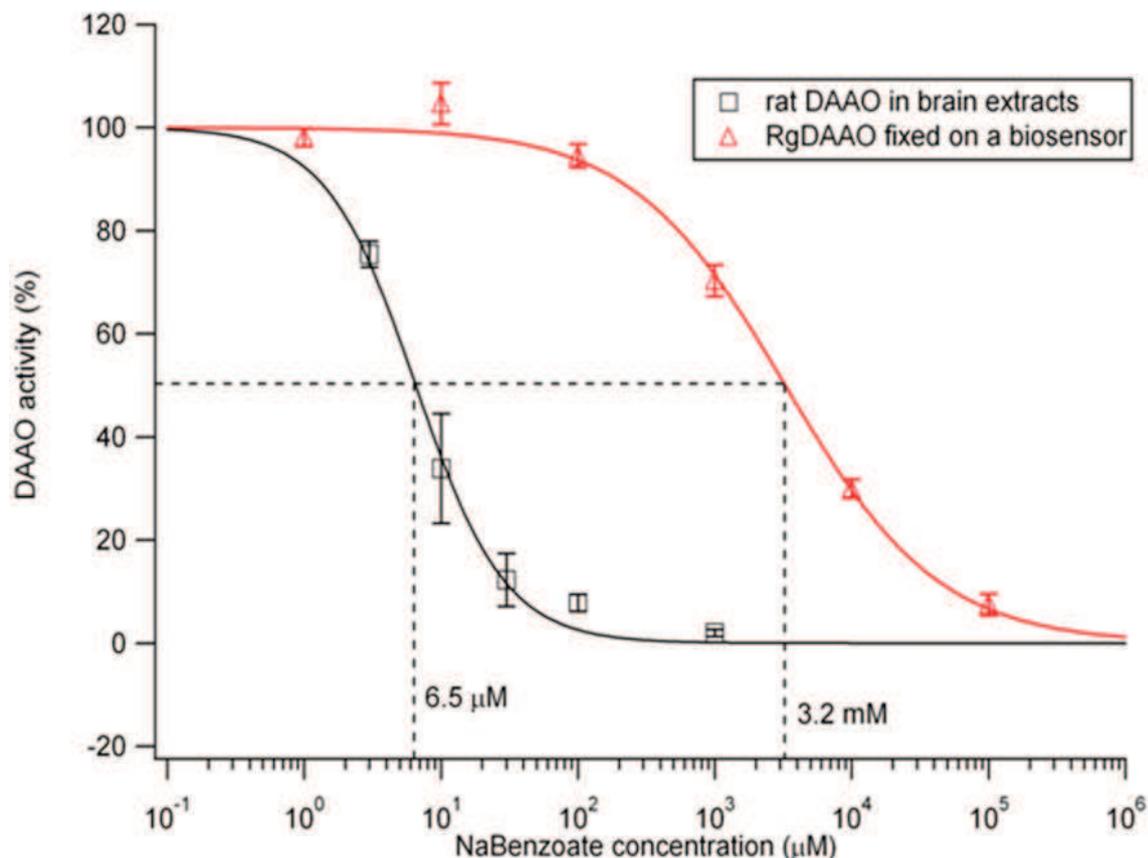


Figure 2: Inhibition of D-amino acid oxidase by benzoate.

The effect of benzoate was tested on rat DAAO activity in cerebellum homogenates and on the sensitivity of the D-serine biosensor ($n=5$). The inhibition profile of both enzymes is very different. It is possible to adjust the dose of benzoate, so that endogenous (mammalian) DAAO is inhibited while the biosensor is still functional.

Ex vivo Serine racemase assay

Serine racemase has two opposite activities, a racemase activity that produces D-serine from L-serine, and α,β eliminase activity, that degrades D-serine into pyruvate. We first tested these two activities in forebrain homogenates. We placed a D-serine biosensor and a control biosensor in a forebrain homogenate. First we injected 300 μM of D-serine and detected a decrease in D-serine concentration that corresponded to the almost total elimination of the D-serine that we added. When SR was inhibited by adding Phenazine Ethosulfate (Et-phen, 100 μM) in the homogenate, D-serine concentration remained stable, suggesting a block in α,β eliminase activity (Figure 3A, C). Et-phen inhibits serine racemase with an IC_{50} of 5 μM and has been used before to inhibit neuronal migration in the cerebellum (Kim et al., 2005). Second, we injected 20 mM of L-serine in the forebrain homogenate and detected an increase in the D-serine signal (Figure 3B, D). When SR was inhibited by Et-phen, D-serine concentration did not change in response to L-serine addition, suggesting a block in racemase

activity. These results indicate that in our cortical homogenates, SR showed α,β eliminase activity or serine racemase activity depending on the availability of D- and L-serine in the recording medium.

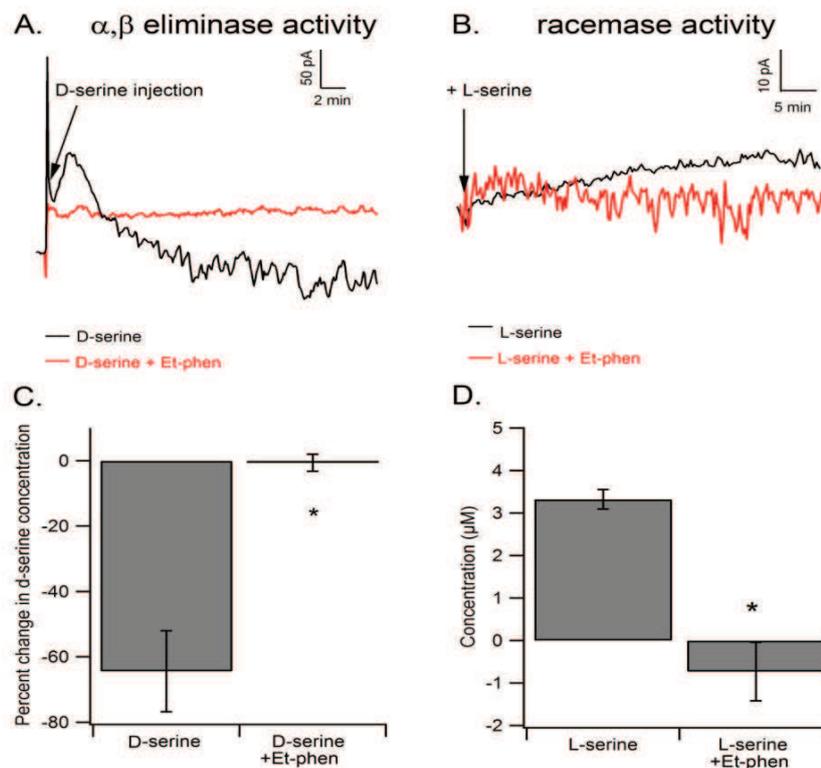


Figure 3: An *ex vivo* assay for serine racemase and α,β eliminase activity

- Detection of D-serine elimination after an injection of 300 μM D-serine in a forebrain homogenate in the presence or absence of Et-phen (n=6).
- Detection of D-serine production after an injection of 20 mM L-serine in a forebrain homogenate in presence or absence of Et-phen (n=6).
- Effect of Et-phen on D-serine degradation by α, β elimination.
- Effect of Et-phen on D-serine production by racemization.

D-amino acid oxidase inhibition improves D-serine penetration through the blood-brain barrier in the cerebellum, but not in the cerebral cortex.

In basal conditions, D-serine extracellular level recorded by the difference between a D-serine and a control biosensor was undetectable (below 0.5 μM) in the cerebellum, and about 1.31 μM in the cortex of anesthetized rats. Two hours after an intraperitoneal injection of D-serine (1g/kg), D-serine extracellular concentration slowly increased by $1.22 \pm 0.27 \mu\text{M}$ in the cortex and $0.9 \pm 0.39 \mu\text{M}$ in the cerebellum (Figure 4A, 4B).

Because DAAO is the primary enzyme mediating D-serine degradation, we determined *in vivo* the effect of DAAO inhibition on D-serine basal levels and penetration into the CNS after such peripheral injection. We injected intraperitoneally 2000 mg/kg of NaBenzoate, 1 h before the intraperitoneal injection of 1 g/kg D-serine. NaBenzoate administered alone did not change the D-serine basal extracellular concentration in the cerebellum. However, DAAO inhibition by benzoate strongly increased D-serine diffusion through the blood-brain barrier in the cerebellum. Two hours after the i.p. D-serine injection, the D-serine oxidation current increased by 94.5 ± 16 pA ($n=5$), which represents an increase of 3.23 ± 0.52 μ M in D-serine extracellular concentration (+358%, Figure 4D,F).

In the cerebral cortex, inhibition of DAAO by benzoate had no significant effect neither on D-serine basal extracellular level, nor on the penetration of D-serine through the blood-brain barrier. Two hours after the D-serine injection, its extracellular concentration had increased by 34.8 ± 6.5 pA ($n=5$) similar to what is found in the absence of DAAO inhibition by benzoate (Figure 1C, E). This result confirmed that DAAO activity was restricted to hindbrain regions such as the cerebellum.

Because D-serine present in the bloodstream can be degraded by DAAO expressed in the kidney (Pollegioni and Sacchi, 2010), we determined whether DAAO inhibition could change blood D-serine levels thereby interfering with its apparent diffusion to the brain. However, NaBenzoate administration did not change D-serine concentration in the serum 1 h after the i.p. injection of 1 g/kg D-serine.

Serine racemase inhibition improves D-serine penetration through the blood-brain barrier in the frontal cortex.

The absence of effect of DAAO inhibition on D-serine levels at rest and in response to D-serine administration suggests that D-serine degradation in the cortex relies on enzymatic pathways independent of DAAO. Serine racemase is a candidate for D-serine degradation in the cortex because of its α,β -eliminase activity demonstrated *in vitro* (Foltyn et al., 2005), and that we detected in forebrain homogenates. When we inhibited serine racemase with an intracerebroventricular (icv) injection of 0.5 μ mol Et-phen, 30 minutes before an intraperitoneal injection of 1g/kg of D-serine, we recorded a larger D-serine penetration through the blood-brain barrier. The D-serine oxidation current increased by 68.63 ± 12.47 pA ($n=6$, $p<0.01$), which represents an increase of 2.36 ± 0.09 μ M. As a control, we injected Ringer in the lateral ventricle 30 minutes before the intraperitoneal injection of D-serine, we recorded a slow increase in D-serine extracellular concentration similar to that found after i.p. D-serine administration alone (without icv injection), which produced an increase in the D-serine oxidation current of 27.94 ± 3.06 pA, representing 1.15 ± 0.12 μ M. An ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test revealed that SR inhibition by Et-phen allowed a significantly greater penetration of D-serine in the frontal cortex ($[F(2, 14) = 26.628, p < 0.01]$, Figure 5A, B).

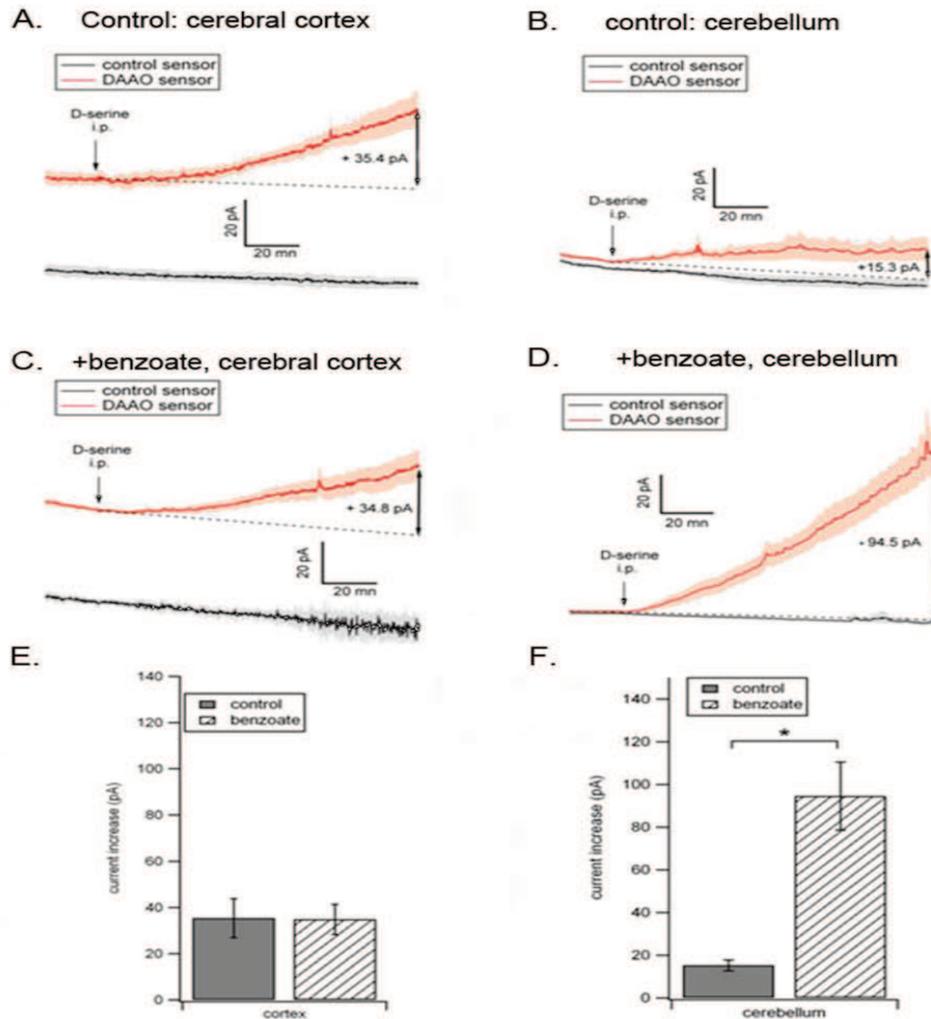


Figure 4: D-Amino Acid Oxidase degraded extracellular D-serine in the cerebellum but not in the frontal cortex.

- D-serine and BSA sensor recordings in the cerebral cortex before and after an intraperitoneal injection of 1 g/kg of D-serine (n=5).
- D-serine and BSA sensor recordings in the cerebellum before and after an intraperitoneal injection of 1 g/kg of D-serine (n=5).
- D-serine and BSA sensor recordings in the cerebral cortex after an intraperitoneal injection of 2000 mg/kg of benzoate 30 minutes before an intraperitoneal injection of 1 g/kg of D-serine (n=5).
- D-serine and BSA sensor recordings in the cerebellum after an intraperitoneal injection of 2000 mg/kg of benzoate 30 minutes before an intraperitoneal injection of 1 g/kg of D-serine.
- Summary data on the effect of benzoate on D-serine oxidation current 2 h after an intraperitoneal injection of D-serine in the cerebral cortex (1g/kg, n=5).
- Summary data on the effect of benzoate on the D-serine oxidation current 2 h after an intraperitoneal injection of D-serine in the cerebellum (1 g/kg, n=5).

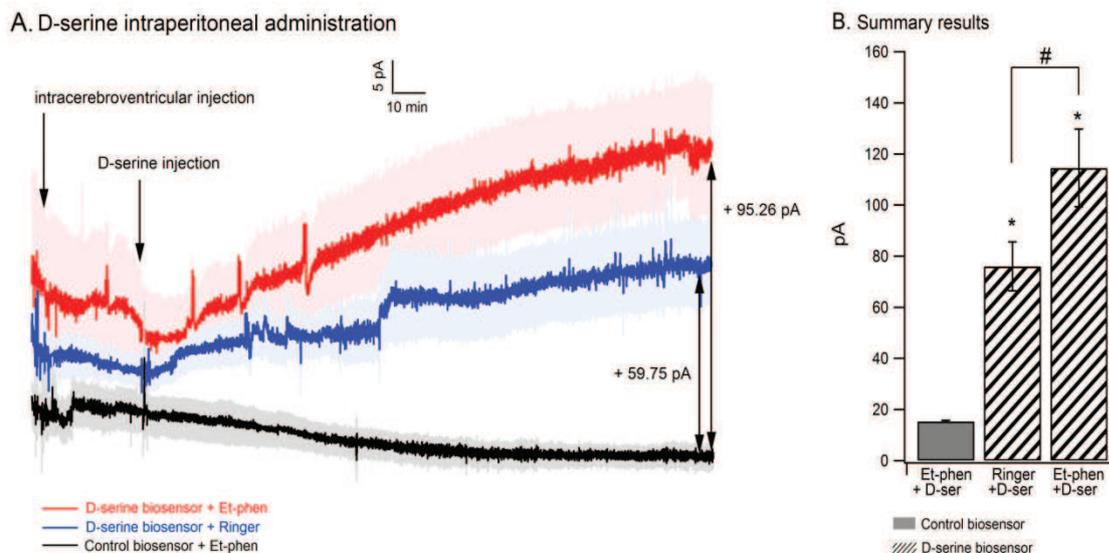


Figure 5: D-serine degradation by serine racemase in the frontal cortex.

- A. D-serine and BSA biosensor recording in the cerebral cortex after an intracerebroventricular injection of 0.5 μmol of phenazine ethosulfate or Ringer 30 minutes before an intraperitoneal injection of 1 g/kg of D-serine (n=6).
- B. Mean \pm SEM values of electrochemical signals recorded 3 h after D-serine administration. *p < 0.01 significantly different to basal level, # p < 0.01, significantly different between Et-phen and Ringer condition (ANOVA with Bonferroni post-hoc, n=6).

Discussion:

In this study, we used a specific biosensor for second-by-second D-serine detection (Pernot et al., 2008). This biosensor does not induce any significant damage to the blood-brain barrier that could interfere with D-serine diffusion from the bloodstream to the brain parenchyma (Pernot et al., 2012). We show that after systemic D-serine administration, most of the D-serine crossing the blood-brain barrier is degraded by DAAO in the cerebellum and by SR in the cortex.

We confirmed *in vivo* and *ex vivo* that DAAO activity is present in the cerebellum, but not in the forebrain (Schell et al., 1995, Wang and Zhu, 2003, Loss et al., 2012). These results are consistent with the study of Hashimoto et al. (1993a) that showed that mice lacking DAAO had the same concentration in the forebrain as control mice.

Although the DAAO protein can be detected immunohistochemically in different areas of the forebrain (Moreno et al., 1999, Verrall et al., 2007), our results indicate that it is not related to a significant enzymatic activity in physiological conditions in rats. In humans, DAAO activity can be detected in the cortex in schizophrenia (Madeira et al., 2008), where it could contribute to pathologically low D-serine levels. In fact, pharmacological DAAO inhibition has been considered for treating schizophrenic patients (Ferraris et al., 2008, Hashimoto et al., 2009).

One specificity of D-serine regulation in the primate brain is the existence of the protein pLG72, that binds to DAAO and regulates its activity. Sacchi et al. (2008) hypothesized that in normal condition, pLG72 interacts with DAAO to decrease its activity. In schizophrenia, pLG72 could be down-regulated, leading an increase in DAAO activity and a decrease in D-serine extracellular concentration. The existence of a similar mechanism in rodents remains to be demonstrated however.

In addition to DAAO-mediated D-serine degradation, we have demonstrated for the first time *in vivo*, that serine racemase can degrade D-serine, probably through an α,β -eliminase activity described previously (Foltyn et al., 2005). *Ex vivo*, both racemase and eliminase activities could be observed, with racemase activity predominating at high L-serine concentrations (20 mM), and eliminase activity becoming apparent at high D-serine concentrations (300 μ M). *In vivo*, blocking SR increased the penetration of peripheral D-serine through the blood-brain barrier, and revealed its importance for D-serine elimination in the forebrain in addition to synthesizing D-serine. The involvement of SR in both D-serine synthesis and degradation places it in ideal position to maintain brain D-serine level close to a stable equilibrium value. SR could display a racemase activity when D-serine levels are low and eliminase activity with they are too high. K_m for L-serine racemisation is very close for mouse and human serine racemase (3.8 ± 0.1 and 4.1 ± 0.2 respectively). However, a significant difference is present in K_m for D-serine elimination, human serine racemase has a three-fold higher K_m than serine racemase mouse (9.5 ± 0.6 versus 3.2 ± 0.3 respectively). (Hoffman et al., 2009). It could be reliable to the presence of pLG72 only in primate, suggesting a different way to eliminate D-serine in rodent and human. Recently, H. Wolosker proposed a serine shuttle hypothesis according to which D-serine is synthesized by SR in neurons, released into the extracellular medium, and taken up in astrocytes to be stored in intracellular vesicles (Wolosker, 2011). Such vesicles have been observed by electron microscopy and their intravesicular concentration has been evaluated around 50 mM (Bergersen et al., 2012). Moreover, these intracellular D-serine stores make up for more than 99 % of the total brain D-serine contents (Pernot et al., 2012). D-serine present in intracellular stores could be released subsequently by astrocytes to modulate synaptic transmission (Henneberger et al., 2010, Papouin et al., 2012).

The eliminase activity displayed by SR in our experiments could possibly be the target of pharmacological manipulation. For example, schizophrenic patients who show decreased forebrain D-serine levels have been shown to benefit from oral D-serine administration in combination with classical antipsychotics such as risperidone (Tsai et al., 1998, Heresco-Levy et al., 2005). Our data suggest that combining D-serine administration with SR inhibition could be an more efficient way of elevating brain D-serine levels than, D-serine alone. Moreover, peripheral D-serine is rapidly degraded by DAAO present in the kidney, causing nephrotoxicity at high circulating concentrations (Carone and Ganote, 1975, Carone et al., 1985). The counterintuitive concept that blocking SR could help increasing brain D-serine levels in schizophrenic patients certainly deserves further attention.

Acknowledgements:

This study was supported by Inserm U1028, Université Claude Bernard Lyon I, and by grants from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0063 Neurosense). PP, CM and NV are recipients of PhD fellowships from Ministère de la Recherche. We thank Aïcha Compard and Animalerie Rockefeller (SCAR) for animal care. The Lyon Neuroscience Research Center is part of SFR Santé Lyon Est (UCBL, UMS 3453 CNRS, US7 Inserm). The authors have no conflict of interest to declare.

IV. Implication physiopathologique de la D-sérine

Chapitre 4

Neuronal loss after *status epilepticus* in rats evidenced by an automatic immunohistochemical quantification of neuronal density

Dans ce chapitre nous avons développé une méthode de quantification simple et automatique pour quantifier la densité neuronale suite à un *status epilepticus*.

Neuronal loss after *status epilepticus* in rats evidenced by an automatic immunohistochemical quantification of neuronal density

Caroline MAUCLER¹, Anne BEGHIN⁴, Denis RESSNIKOFF⁴, Laurent BEZIN³ and Stéphane MARINESCO^{1,2,*}

¹INSERM U1028; CNRS UMR5292 Lyon Neuroscience Research Center, Integrated physiology of the waking state, Lyon, F-69000, France.

²Plate-forme technologique AniRA-Neurochem, University Lyon 1, Lyon, F-69000, France.

³INSERM U1028; CNRS UMR5292 Lyon Neuroscience Research Center, Translational and Integrative Group in Epilepsy Research, Lyon, F-69000, France.

⁴Centre Commun de Quantimétrie, University Lyon 1, Lyon, F-69000, France

* corresponding author: Stéphane Marinesco, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France.

Tel : +33 (0)4 78777041, Fax : +33 (0)4 78777150, Email: stephane.marinesco@univ-lyon1.

Abstract:

Status epilepticus, a state of intractable persistent seizure, produces extensive neuronal injury in both humans and animals. To study neurotoxic processes in this pathology, it is necessary to quantify precisely the number of neurons in a given structure and estimate neuronal loss. The most precise method relies on unbiased stereological estimations. However, such measurements are time-consuming and have only been applied to the hippocampus. Alternatively, neuronal densities in extended regions of the brain can be roughly estimated by quantifying the immunoreactivity to a neuronal marker such as the protein NeuN. However, such quantifications can be biased by changes in the expression of the protein of interest independently of neuronal density. In this study, we developed a simple automatic quantification of neuronal densities on brain slices stained with a NeuN antibody and DAPI. This method relies on ImageJ procedures, and consists in determining the number of nuclei (stained with DAPI) that are immunoreactive to NeuN in at least two adjacent sections within a z-series of optical sections spaced by 1 μm . Using this method, we identified a significant decrease in neuronal density in the piriform cortex, the amygdala, the dorsal thalamus, area CA3 of the hippocampus, the dentate gyrus and the hilus. This decrease was accompanied by an increase in the total density of cellular nuclei within these brain structures, suggesting a significant neuronal loss and gliosis. This method can be easily applied to other models of brain injury and neurodegeneration.

Keywords: excitotoxicity, status epilepticus, quantification, image J

Introduction:

The toxic effect of glutamate was first described in 1957 in the retina (Lucas and Newhouse, 1957). The concept of excitotoxicity, first introduced by Olney (1969), (Olney, 1969), consists in an excessive or prolonged activation of excitatory amino acid receptors. The implication of the NMDA receptors in this process was confirmed by Choi (1987). Excitotoxic processes are implicated in several neurodegenerative disorders like Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis or status epilepticus (Jansen et al., 1990, Bruijn et al., 2004). The pilocarpine model of *status epilepticus* (SE) was developed by Turski et al. (1983). It is characterized by generalized seizures and can last up to 24 hours without full recovery of consciousness between seizures (Cavalheiro, 1995). The induction of SE leads to a severe and widespread neuronal loss (Fujikawa, 2005, Scorza et al., 2009). This neuronal loss is present in the limbic structures like the different structures of the hippocampus, the amygdala, the entorhinal region and in others structures like piriform cortex, subiculum and thalamus (Sperk, 1994, Mello and Covolan, 1996, Covolan and Mello, 2006, Scorza et al., 2009). To understand the neurotoxic mechanisms leading to such neuronal injury, it is necessary to quantify the extent of neuronal loss in different brain areas.

Different methods of quantification are available to assess neuronal damage in the brain. Stereological methods are the most precise and use the optical disector or fractionator technique (West et al., 1991). These methods estimate neuronal densities per unit of volume in isotropic brain regions (Mandarim-de-Lacerda, 2003). This method requires that the brain structure under investigation be isotropic and its volume precisely measured (West, 1999). For these reasons, such techniques have been restricted to specific brain regions, principally, the hippocampal formation (Carvalho et al., 2011). To assess neuronal damage more simply, a common method consists in labeling a neuronal marker with fluorescent antibodies and quantifying the overall fluorescence intensity by a grading system. The severity of the observed lesion is established on a scale based on the percentage of fluorescence vs the control fluorescence, or on a subjective scale. The major weakness of this method is that the overall fluorescence intensity can be impacted by different parameters like the expression level of the marker protein or its antigenicity, independently of neuronal density its subjectivity (Mikati et al., 1994, Halonen et al., 2001, Brandt et al., 2003, do Nascimento et al., 2012). There is a need for simple, methods capable of quantifying precisely the neurons in any part of the central nervous system (CNS). In this study we developed a method based on the analysis of confocal images stained by DAPI and the neuronal marker NeuN, by a set of procedures running under the open-access software Image J. These procedures consist in quantifying the density of nuclei (DAPI positive) located in NeuN-positive regions (neurons).

Materials and methods:

Animals:

All *in vivo* experiments were performed on Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) weighing 150-200g. All experimental protocols were approved by the local committee on animals in research at the University Claude Bernard Lyon I, and were performed in accordance with European directive 86/609/CEE.

Status Epilepticus (SE):

Rats were first injected intraperitoneally with scopolamine methylbromide (1mg/kg, sigma, Saint Quentin Fallavier, France), then 30 min later, with pilocarpine hydrochloride (350mg/kg, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). SE was monitored visually to detect the appearance of behavioral signs of seizures such as tremors, chewing, salivation, vibrissae twitching or head nodding (Cavalheiro, 1995). Such signs usually appeared within 20 min of the pilocarpine injection. Two hours after the injection of pilocarpine, SE was stopped by an injection of diazepam (Valium, 10mg/kg, Roche). Rats without behavioral signs of seizures were excluded from the study, which represented 10.53 % of the animals. Animals were then kept for 10 days and assisted for drinking and feeding if necessary. They were then deeply anesthetized by an intraperitoneal injection of pentobarbital (0,2ml/100g, Ceva®, Libourne, France) and perfused through the heart with fixative solution consisting in paraformaldehyde 4%. The brain was removed and frozen in a solution of isopentane at -50°C and stored at -80°C.

Fluorescent double-labeling immunohistochemistry:

Rat brains were cut into 20µm thick sections and immobilized on slides. Individual sections are surrounded with a hydrophobic pen (Clinisciences, France) and permeabilized with a solution of phosphate buffered saline 0.01% (PBS, pH=7.4, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), triton-X-100 3% (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and goat serum 1% (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) during 30 min washed 3 × 10min each with PBS and Tween 20 (PBST, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Sections are incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal antibody against NeuN diluted at 1:2000 (MAB-377, Millipore) in a solution of PBST and goat serum 2%. After 3 × 10 min PBST washes, sections are incubated 1h with an Alexa fluor 488 goat anti mouse IgG antibody diluted at 1:1000 (Invitrogen) and DAPI 1:1000 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in a solution of PBS-Triton X100 3% (PBST) with 2% goat serum. After 5 × 10 min PBS washes, slides are mounted with fluomount (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

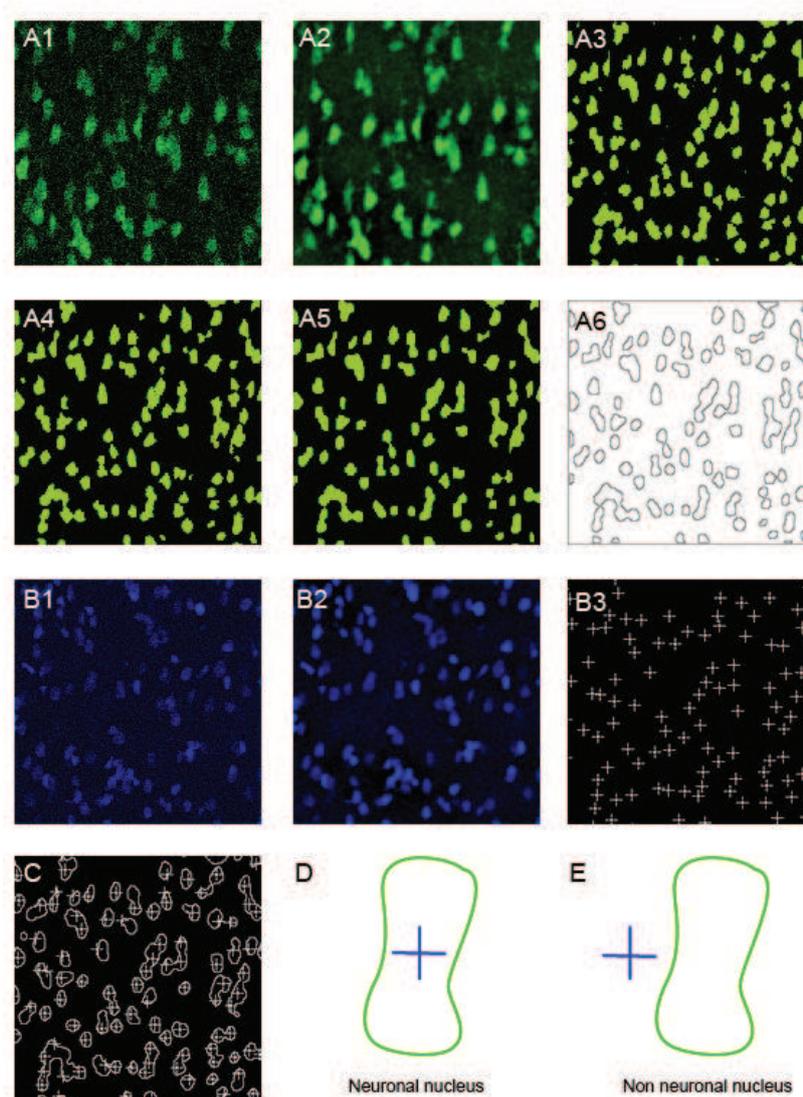


Figure 1: schematic representation of neuronal density quantification on a single optical section.

A. processing of the NeuN-positive regions.

A1. Original image of a brain slice (cortex) in the 510-613 nm channel (NeuN-Alexa 488 staining). **A2.** Digital filtering using band pass filter in the Fourier domain. **A3.** Image binarization using autothreshold. **A4.** Removal of particles smaller than 50 square pixels square are removed. **A5.** Objects closure using morphomath. **A6.** NeuN –positive objects are merged into a single selection.

B. Processing of the DAPI-positive regions.

B1. Original image in the 418-473 nm channel (DAPI staining). **B2.** Digital filtering using a band pass filter in the Fourier domain. **B3.** The center of each nucleus is represented by a cross at the maximum fluorescence intensity **C.** Each cross present in the green positive region represents a neuronal nucleus. **D.** schematic representation of the NeuN/DAPI configuration leading to the recognition of a neuronal nucleus. **E.** Example of an object treated as non neuronal nucleus.

Confocal microscopy:

Slices were imaged at the Cecil (Lyon, Université Laennec, Lyon 1, France) using a Confocal spectral microscope Leica SP5 with a 20X objective. Image analysis was performed using imageJ software and an automatic custom-made macro developed by the Centre Commun de Quantimétrie (Lyon 1, France). Brain slices were imaged using a confocal spectral microscope Leica SP5 with a 20X lens equipped with a 510-613 nm filter for Alexa 488 and a 418-473 nm filter for DAPI. A Z-series of 15 to 20 optical sections spaced by 1 μm were imaged within each slice. Individual images were averaged 3 times NeuN labeling and twice for DAPI.

Statistical analysis:

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between two data groups were performed using two-tailed Student's *t* test for equal or unequal variances, as determined by the F test (significance level of $p < 0.05$).

Results:*Principles of the automatic macro with image J*

NeuN protein is one of the most common neuronal marker; it is located in neuronal perikaria and nuclei of neuronal cell bodies and can be readily detected using commercial antibodies (Wolf et al., 1996). To quantify neuronal density on a brain slice, we determined automatically the number of nuclei located in a NeuN-positive region. We developed an Image J macro-command to process the confocal images in three basic steps consisting in (1) determining the NeuN positive regions on the image, (2) determining the position of DAPI-stained nuclei within the NeuN-positive regions, and (3) confirm the presence of each NeuN-positive nucleus in at least two adjacent optical sections within the slice.

Specifically, each optical section was processed as follows:

- *Determination of NeuN-positive regions*

Images obtained with the 510-613 nm filter (Fig.1 A1) were first processed using Fast Fourier Transform and a band-pass filter keeping objects between 3 and 40 pixels (Fig.1 A2). The image was then binarized using an automatic threshold method (Li or moments, Fig. 1 A3). The macro then removed all objects smaller than 50 square pixels (at 20X magnification, $36.5 \mu\text{m}^2$) using the “analyze particles” command (Fig. 1 A4). Finally, objects were closed

using the “morphomath” command (Fig. 1 A5) and assembled into a single ensemble representing the NeuN-positive region within the slice.

- *Determination of DAPI-positive nuclei*

Images obtained with the 418-473 nm filter were first filtered using a Fast Fourier Transform and a band pass filter keeping objects between 3 and 40 pixels (Fig1 B2). All pixels outside the NeuN-positive region were then set to zero, thereby discarding putative non-neuronal nuclei. We then used the “Find Maxima” command to determine the center of DAPI-positive nuclei. Only pixels with a fluorescence intensity at least 10 grey levels above background were considered. For such pixels, the macro determined a region of interest composed of all pixels with an intensity 10 grey levels below the maximum as the area of the nucleus. The pixel of maximum intensity within this area was then determined as the center of the nucleus (marked with a cross, Fig. 1B3). The macro could then assess the total number of NeuN-positive DAPI-stained nuclei in the optical section.

In some instances, nuclei centers lying at the border of the NeuN region could not be unequivocally identified as neurons. We therefore introduced a third processing step consisting in analyzing several adjacent optical sections within the same slice and selecting only those nuclei centers that were present in a NeuN-positive region in at least two optical sections. For this purpose, all adjacent optical sections (between 15 and 20 per slice) were analyzed and the number of nuclei present in NeuN-positive regions (positive nuclei) were counted. The optical section with the highest number of positive nuclei was then chosen as the central section. The macro then selected the two adjacent sections immediately below and above the central section. On each of these four sections, the regions surrounding each positive nucleus (at least 10 units below the maximum) were selected and merged into a single region of interest. A maximal projection of these four regions of positive nuclei was then performed. Positive nuclei present on the central section that lied within this projection therefore represented a nucleus lying in a NeuN-positive region in at least two of the five optical sections that were analyzed. Using this selection, less than 5% of the positive nuclei identified on the central section were eliminated, probably representing glial cells with a nucleus lying in close proximity to a neuronal cell body.

Automatic threshold procedures

The macro that we designed requires an autothreshold step to binarize the images and determine NeuN-positive regions. We tested several autothreshold procedures, including Huang, Yen, Li, and Moments methods (Tsai, 1985, Huang and Wang, 1995, Yen et al., 1995, Sezgin and Sankur, 2004). Unfortunately, none of these methods could successfully binarize all the immunohistochemical images from our brain slices. In fact, we observed two different sets of brain regions: (1) the neocortex, amygdala, piriform cortex thalamus, and hilus were characterized by sparse neuronal cell bodies and were correctly binarized using the Moments autothreshold method, and (2) the CA1, CA3 and dentate gyrus regions of the hippocampal formation, characterized by densely packed neuronal cell bodies were successfully processed

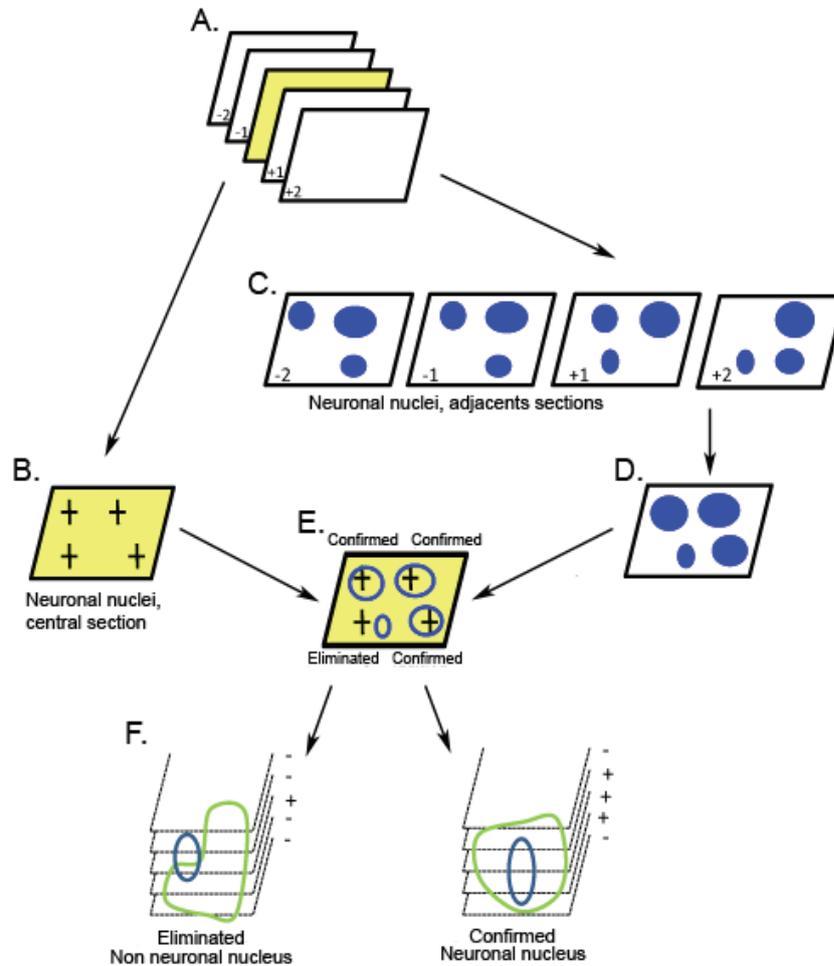


Figure 2: Confirmation of neuronal nuclei on adjacent optical sections.

A. The optical section with the largest density of neuronal nuclei was selected within the z-series (interval 1 μm), together with the two adjacent sections above and below. **B.** The central slice is processed in isolation and NeuN-positive nuclei are identified. **C.** For each of the 4 adjacent sections, the macro determines NeuN-positive nuclei and their surroundings (10 grey levels below the maximal fluorescence intensity). **D.** A maximal projection of all NeuN-positive regions on the four adjacent sections is performed. **E.** When a NeuN-positive nucleus on the central section falls within the projection of NeuN-positive nuclei in the four adjacent sections, the neuronal identity of the nucleus is confirmed (i.e. the nucleus is NeuN-positive in at least two optical sections). **F.** Schematic representation of NeuN and DAPI stainings leading to the confirmation or elimination of a neuronal nucleus.

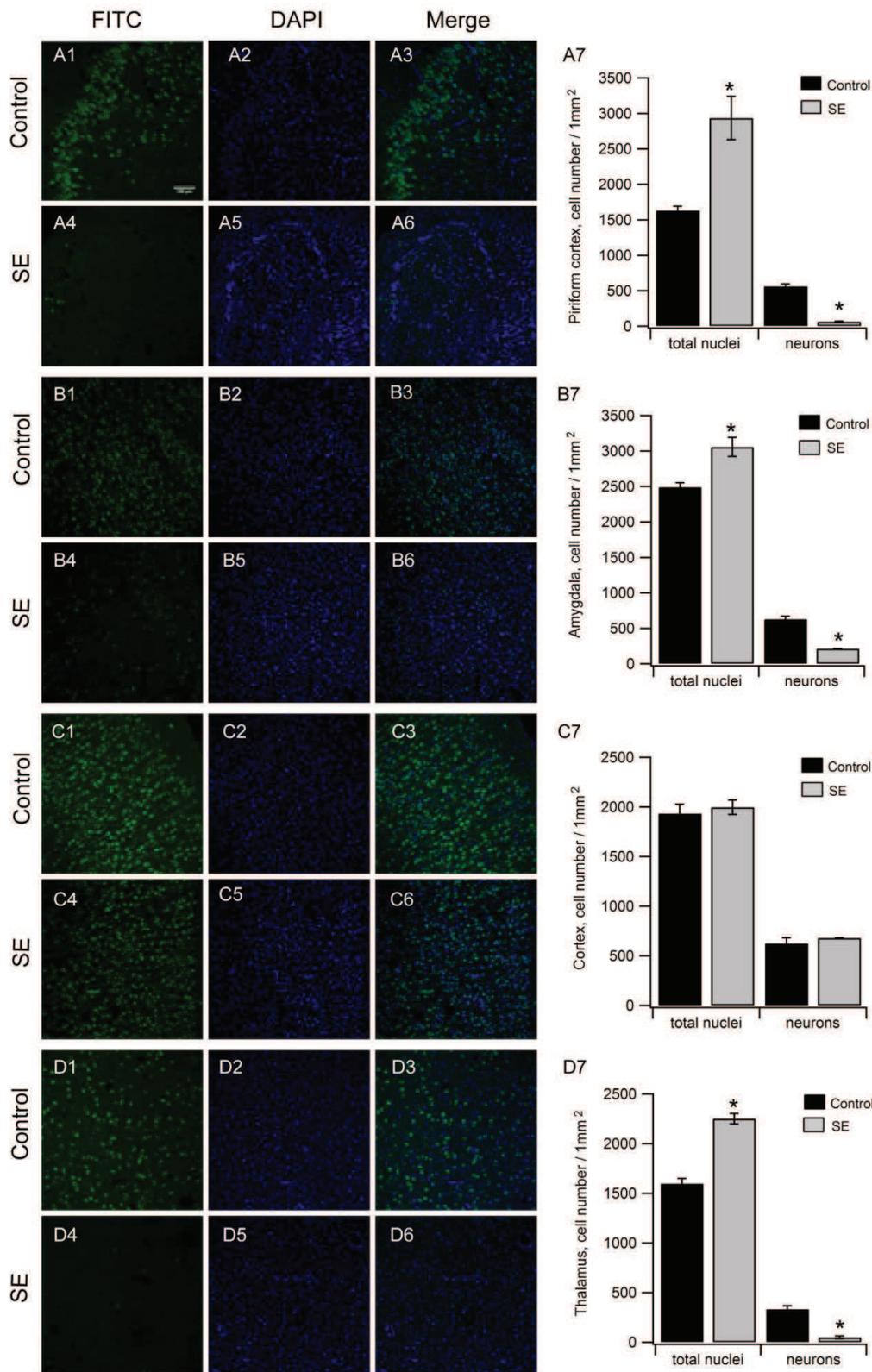


Figure 3: Quantification of neuronal density in the piriform cortex, amygdala, somatosensory cortex and thalamus.

A. Piriform cortex. **A1.** Control FITC staining. **A2.** Control DAPI staining. **A3.** Control merge. **A4.** SE FITC staining. **A5.** SE DAPI Staining. **A6.** SE merge **A7.** Summary results showing the quantification of neuronal and cellular densities in the image

B. Amygdala. **B1 to. B7.** Same as A1 to A7 **C.** Cortex. **C1 to. C7.** Same as A1 to A7 **D.** Thalamus. **D1 to. D7.** Same as A1 to A7. Scale bar: 100 μ m

using the Li autothreshold method. Therefore, for a given brain region, identical automatic processing steps were performed in control and SE animals. It was nonetheless essential that all images be taken with the exact same settings on the confocal microscope (i.e. laser intensity, gain, etc.).

Neuronal density in brain slices from control and status epilepticus rats

The pilocarpine model of status epilepticus is known to induce widespread damage in the forebrain in rats and mice (Turski et al., 1983, Turski et al., 1984). We quantified neuronal density in control and SE animals in eight different brain regions: the somatosensory cortex (S1), hippocampal regions CA1, CA3, dentate gyrus and hilus, dorsal thalamus, amygdala and piriform cortex. We also determined the total cellular density as the number of nuclei (DAPI-positive) per mm². Both neuronal density and cellular density analyses are shown in Fig. 4 and 5.

Ten days after SE, neuronal density was the most decreased in the piriform cortex (64.1 ± 6.3 vs. 562.5 ± 32.6 neurons per mm², $p < 0.01$, Fig. 4A), amygdala (214.2 ± 57.6 vs 631.5 ± 40.0 neurons per mm², $p < 0.01$, Fig. 4B), dorsal thalamus (50.2 ± 12.8 vs. 335.0 ± 33.8 neurons per mm², $p < 0.01$, Fig. 4C), hilus (23.5 ± 3.5 vs. 65.8 ± 6.7 neurons per mm², $p < 0.01$, Fig. 5C) and in the dentate gyrus (1879.0 ± 160.9 vs 2601.9 ± 130.0 neurons per mm², $p < 0.01$, Fig. 5D). The decrease in neuronal density was less pronounced but still significant in area CA3 (690.2 ± 68.3 vs. 914.5 ± 51.9 neurons per mm², $p < 0.05$, Fig. 5B), Finally, there was no significant difference in neuronal density in the somatosensory cortex (682.4 ± 92.1 vs. 625.3 ± 59.8 neurons per mm², $p = 0.25$, Fig. 4C) and in area CA1 of the hippocampus (656.9 ± 76.1 vs. 789.6 ± 80.5 neurons per 1mm², $p = 0.25$).

On the contrary, cellular density representing both neuronal and non-neuronal (mostly glial) cells increased 10 days after SE. The increase was largest in the piriform cortex (2938.1 ± 304.8 vs. 1631.7 ± 61.2 nuclei per mm², $p < 0.01$, Fig. 4A), amygdala (3056.3 ± 135.9 vs. 2491.5 ± 64.1 nuclei per mm², $p < 0.01$, Fig 4B), dorsal thalamus (2251.5 ± 52.9 vs. 1597.8 ± 51.9 nuclei per mm², $p < 0.01$, Fig.4C), in area CA1 (2271.7 ± 128.0 vs. 1879.7 ± 61.5 nuclei per mm², $p < 0.05$, Fig. 5A), CA3 (2360.6 ± 175.1 vs. 1757.9 ± 62.4 nuclei per mm², $p < 0.05$, Fig.5B), and hilus (2688.4 ± 268.8 vs 1989.2 ± 146.5 nuclei per mm², $p < 0.05$, Fig. 5C). There was no difference in cellular density in the somatosensory cortex (1997.7 ± 62.8 vs 1935.2 ± 93.0 nuclei per mm², $p = 0.6$, Fig.4C) and dentate gyrus (3789.9 ± 295.0 vs. 4368.7 ± 19.1 nuclei per mm², $p = 0.13$, Fig. 5A).

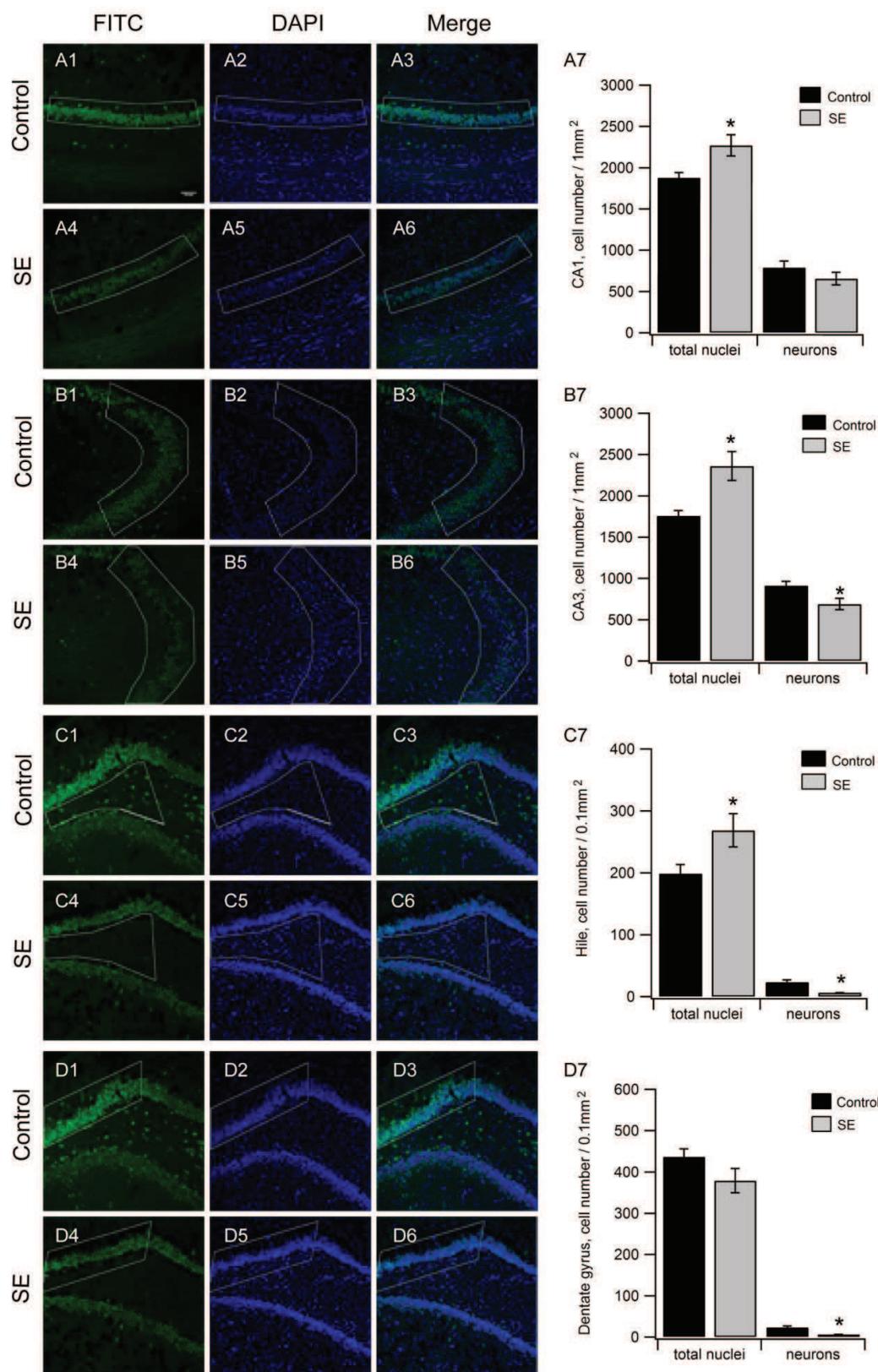


Figure 4: Quantification of neuronal density in the hippocampal formation CA3, CA1, hilus and dentate gyrus.

Similar numbering as in Figure 3 (A1 to D7). The regions of interest used for the quantification as shown with white lines. Scale bar: 100µm

Independence between neuronal count and NeuN staining intensity

The intensity of NeuN staining is known to decrease in compromised neuronal tissue (Collombet et al., 2006b), and this effect can seriously impact the overall assessment of neuronal density based on the NeuN marker. In our experiments, NeuN intensity 10 days after SE was significantly diminished: 66.6 ± 1.9 vs 82.0 ± 2.9 in the somatosensory cortex ($p < 0.01$) 50.5 ± 3.5 vs 62 ± 3.2 in the piriform cortex ($p < 0.05$), 51.6 ± 3 vs 72.4 ± 4.3 in the amygdala ($p < 0.01$). Interestingly, the neuronal density in the somatosensory cortex estimated by our Image J macro was similar in control and SE animals despite this decrease in NeuN intensity. This result indicates that our macro can accommodate moderate changes in NeuN intensity without significant perturbation in the neuronal cell count.

Discussion:

In the present study, we have developed a new method to quantify neuronal density. This custom made macro is simple and easily reproducible. It employs an open-access software based on ImageJ that is usable with all types of confocal microscopes. It has the advantages of being able to be used in all structures of the CNS. It is possible, by adapting the autothreshold method to the brain structure of interest, to analyze virtually any area of interest within brain slices. SE represents a pathological model in which extensive neuronal loss has been described. With the present method, we could quantify precisely neuronal density in control and SE animals, and therefore, estimate neuronal loss in different brain regions. The imageJ procedures we designed allowed us to count neurons even in areas with tightly-packed neurons like in dentate gyrus, or areas CA1 and CA3 of the hippocampus. We saw a significant decrease in the intensity of the NeuN staining in the SE brain slices in the somatosensory cortex, piriform cortex and amygdala. This observation is consistent with previous reports (Unal-Cevik et al., 2004). In particular, Collombet et al (2006) suggested that this loss of immunoreactivity could be due to a decrease in antigenicity. It is unclear whether neurons with decreased NeuN immunoreactivity are destined to die or whether the NeuN signal can be recovered over time (Liu et al., 1997, Unal-Cevik et al., 2004). It is interesting to note that with our method of quantification, we were able to count neurons even in the presence of this decrease in fluorescence intensity. This probably results from the use of autothreshold procedures that do not rely on overall fluorescence intensity, but rather, on the contrast between NeuN positive regions and the background. If our method was impacted by the decrease in NeuN intensity, neuronal density in the somatosensory cortex would not remain constant between control and SE animals, but rather, would decrease due to the diminution of NeuN fluorescence. This result indicates that our cell counts are independent of the changes in NeuN immunofluorescence observed after SE. Our ImageJ procedure is therefore superior to semiquantitative methods that rely on the overall intensity of NeuN fluorescence within specific brain regions that can be seriously biased by these changes in NeuN expression and/or antigenicity after SE (Halonen et al., 2001, do Nascimento et al., 2012).

We showed a significant loss of neurons in the piriform cortex, amygdala, thalamus, CA3, hilus and dentate gyrus. These results are consistent with the literature, since neuronal death has already been described in these brain areas (Turski et al., 1983, Cavalheiro, 1995, Mello and Covolan, 1996, Aroniadou-Anderjaska et al., 2008). By contrast, the somatosensory cortex was not impacted by SE and no change in neuronal density could be evidenced. Concerning CA1, our approach did not identify any significant neuronal loss. In the literature however, contrasting results have been reported. Cavalheiro (1995) did not show any significant loss of neurons whereas other teams showed decreased neuronal densities (Brandt et al., 2003, Carvalho et al., 2011, Tyler et al., 2012). Several technical reasons might explain these contrasting results. Studies by (Shatskikh et al., 2009, Tyler et al., 2012) used semi-quantitative methods that quantified the overall intensity of NeuN immunoreactivity. Carvalho et al. (2011) used a stereological method of quantification that is perhaps the gold standard for estimating neuronal number in a specific brain structure. However, SE in their experiments lasted for 5h, compared to 2 h in our study. It is possible that if we had extended the duration of SE in our animals, neuronal death in CA1 would have been significant. In addition, variability in the neuronal lesions produced by SE can arise from the method of pilocarpine administration (pilocarpine –lithium vs. pilocarpine alone), or from the strain of the animals (Schauwecker, 2012). In the piriform cortex, amygdala, CA3, CA1, hile and thalamus, our method also quantified a significant increase in the total number of nuclei, probably reflecting proliferation of glial cells. In fact, epithelial cells from blood vessels and pericytes represent a minority of non-neuronal cells in the brain. Neuronal death accompanied by a glial cell proliferation has already been described after SE (Scorza et al., 2009), representing a population of the damaged areas. With our method we cannot differentiate the type of glial cells. In the hippocampus, a change in microglia morphology and a proliferation of these cells is showed (Avignone et al., 2008, Sun et al., 2012). Like microglial cells, astrocytes appear to also proliferate and to transform in reactive astrocytes after SE (do Nascimento et al., 2012). Interestingly, CA1 showed a significant increase in the number of total cells without significant neuronal death. Some data indicate that neural progenitors in the adult caudal subventricular zone (cSVZ) migrate to regions with damage in the hippocampus and replace injured CA1 pyramidal neurons (Nakatomi 2002). It is therefore possible that some of the cells proliferating after SE in this area reflect neuronal progenitors aimed at replacing injured neurons (parent 2006).

In conclusion, we presented a new method for quantifying neuronal density in brain slices. It is simple and can be used in virtually all brain structures. Using this method, we largely confirmed and extended previous data on neuronal lesions produced by SE in the rat brain.

Chapitre 5

Implication de la D-sérine et du glutamate dans le *status epilepticus* chez le rat vigi

Ce chapitre étudie le rôle de la D-sérine et du glutamate dans la mort neuronale dans un modèle de *status epilepticus* chez le rat vigi. Des marquages immunofluorescents ont également été réalisés pour déterminer l'importance des processus excitotoxiques dépendant des récepteurs NMDA dans la mort neuronale.

Introduction :

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant du système nerveux central des mammifères. Il est l'agoniste principal du récepteur N-Méthyl D-Aspartate (NMDA) dont l'activation nécessite la fixation d'un co-agoniste, la D-sérine ou la glycine. Les effets toxiques du glutamate ont été décrits en 1957 pour la première fois dans la rétine (Lucas and Newhouse, 1957). Le concept d'excitotoxicité définie comme l'activation excessive ou prolongée des récepteurs par des acides aminés exciteurs a été proposé en 1969 (Olney, 1969).

L'épilepsie est une pathologie neurologique caractérisée par des crises discontinues, récurrentes, spontanées et des neurones hyperexcitables (Bozzi et al., 2012). Le *status epilepticus* (SE) est une forme particulière d'épilepsie, caractérisé par des crises généralisées et continues, durant plus de 30 minutes sans récupération totale de conscience entre deux crises (Chen et al., 2007). Des études IRM montrent une neurodégénérescence de l'hippocampe ou sclérose hippocampique chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (Davies et al., 1996, Fuerst et al., 2001, Mathern et al., 2002). L'origine excitotoxique de la perte neuronale est supposée mais non démontrée chez les patients. Plusieurs modèles animaux par déclenchement pharmacologique du *status epilepticus* ont été développés. L'induction pharmacologique du *status epilepticus* par la pilocarpine, un agoniste des récepteurs muscariniques M1 (Hamilton et al., 1997), provoque une perte neuronale sévère et étendue dans de nombreuses aires du cerveau (Smolders et al., 1997, Aroniadou-Anderjaska et al., 2008). Le MK-801, également connu sous le nom de dizocilpine, est un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA. Il bloque les récepteurs NMDA activés à la fois synaptiques et extrasynaptiques. Son administration a un effet neuroprotecteur suggérant ainsi une implication de mécanismes excitotoxiques (Marksteiner et al., 1990, Fujikawa et al., 1994, Brandt et al., 2003, Schauwecker, 2010).

Le glutamate est le principal acide aminé exciteur du SNC. Wilson et al. (1996) ont mesuré la concentration de glutamate extracellulaire chez des patients épileptiques depuis de nombreuses années par microdialyse et ils ont montré une augmentation de sa concentration suite à une crise épileptique. Des mesures de la concentration extrasynaptique de glutamate chez le rat, également par microdialyse, confirment ces résultats après déclenchement du *status epilepticus* par du kaïnate ou de la pilocarpine (Tanaka et al., 1996, Wilson et al., 1996, Liu et al., 1997). Le glutamate n'est pas le seul acide aminé exciteur envisagé comme acteur de l'excitotoxicité, le rôle des co-agonistes est également étudié. Des souris knock-out pour la sérine racémase, enzyme de synthèse de la D-sérine, présentent une diminution de 90% de la concentration extracellulaire de D-sérine et ont une réduction de la neurotoxicité induite par les récepteurs NMDA suite à des injections de NMDA dans le télencéphale (Inoue et al., 2008). La D-sérine, contrairement à la glycine, est le co-agoniste impliqué dans l'excitotoxicité (Shleper et al., 2005, Papouin et al., 2012). Des changements dans la concentration de D-sérine ont été montrés dans un modèle de SE (Liu et al., 2009, Ryu et al., 2010). Une indication supplémentaire de l'implication de la D-sérine dans le SE est une résistance et une diminution de la durée des crises généralisées chez des souris KO pour la sérine racémase (Harai et al., 2012).

Dans cette étude, nous avons appréhendé le rôle de la D-sérine et du glutamate dans la mort neuronale par excitotoxicité dans un modèle de *status epilepticus* chez le rat vigils. Nous avons tout d'abord réalisé des marquages immunofluorescents pour déterminer l'effet du MK-801 et définir la fenêtre temporelle de l'excitotoxicité. Ensuite, nous avons déclenché un SE chez des rats vigils et enregistré les concentrations de D-sérine et de glutamate dans deux zones, le cortex piriforme/amygdale, zone fortement touchée par des processus excitotoxiques et dans le cortex, zone sans perte neuronale excitotoxique (IV, Chapitre 4). Pour cela, nous avons utilisé des biocapteurs enzymatiques permettant une détection seconde par seconde de la D-sérine et du glutamate. Nos résultats montrent que la mort neuronale est due à des processus excitotoxiques et impliquent non seulement le glutamate mais également la D-sérine dans l'excitotoxicité.

Matériels et méthodes :

Animaux :

Toutes les expériences ont été réalisées chez des rats mâles Wistars (élevage Janvier Le Genest Saint Isle, France) pesant entre 150 et 200g. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et sont en accord avec la directive européenne 86/609/CEE.

Opération des rats vigils :

Les animaux sont anesthésiés sous isoflurane et équipés d'un système de canules ajustables permettant l'insertion de biocapteurs dans le système nerveux central d'animaux vigils. Une fois anesthésié, le rat est placé sur une couverture chauffante avec une sonde rectale pour maintenir sa température corporelle à des valeurs physiologiques. Ensuite le crâne du rat est dégagé après administration locale de lidocaïne sur la plaie (Xylocaïne 1%). Le crâne et la dure-mère sont retirés. Les canules sont positionnées pour l'implantation des biocapteurs soit dans le cortex piriforme/amygdale, soit dans le cortex. Une électrode de référence nécessaire aux enregistrements électrochimiques est également implantée au contact de la dure-mère. Après la phase de chirurgie, les animaux peuvent récupérer pendant 8-10 jours au cours desquels ils reçoivent des soins antiseptiques et analgésiques quotidiens.

Induction du status epilepticus et enregistrement :

Les biocapteurs sont insérés dans le système nerveux central des animaux vigils 1h avant le début de l'expérimentation. La scopolomine méthylbromide (1 g/kg, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) est d'abord administrée en intrapéritonéal, puis le status epilepticus est induit 30 min plus tard par une injection de pilocarpine (350 mg/kg, Sigma Aldrich, Saint

Quentin Fallavier, France) en intra-péritonéal est réalisée. Le *status epilepticus* est caractérisé par des tremblements continus et des pointes ondes sur l'enregistrement ampérométrique. Deux heures après l'injection de pilocarpine, le *status epilepticus* est arrêté par une injection de diazépam (valium, 10 mg/kg, Roche). Les rats ne présentant aucun tremblement sont exclus de l'étude. Le MK-801 (dizocilpine, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) est administré en intra-péritonéal deux heures après l'injection de pilocarpine, conjointement à l'injection de valium. Les rats contrôles ont reçu une injection de NaCl 0,9 % au moment de chaque injection. 10 jours plus tard les rats sont euthanasiés avec une injection intra-péritonéale de pentobarbital (0,2ml/100g, Ceva®, Libourne, France).

Marquages immunofluorescents :

Des coupes de 20 μ M d'épaisseur sont obtenues à partir de cerveaux fixés au paraformaldéhyde 4% et coupées à l'aide d'un cryostat. Les coupes sont directement récupérées et étalées sur lame superfrost (Fischer Scientific, France). Les coupes sont ensuite entourées à l'aide d'un stylo hydrophobe (Clinisciences, France) pour permettre les réactions immunohistochimiques directement sur lame. Les coupes sont d'abord perméabilisées à l'aide d'une solution de phosphate buffer saline 0.01% (PBS, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), triton-X-100 3% (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et sérum de chèvre 1% (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) pendant 30 min. Après 3 lavages au PBS-Tween 1% de 5 min chacun, les coupes sont incubées pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire monoclonal de souris dirigé contre la protéine NeuN dilué au 1/2000 dans un mélange de PBS-tween 1% et de sérum de chèvre 2%. Le lendemain, 3 lavages au PBS-Tween 1% de 10 min sont réalisés avant d'incuber les coupes pendant une heure à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa 488 dilué au 1/1000, de DAPI au 1/1000, de PBS-tween à 1% et de sérum de chèvre 2%. Après 5 lavages au PBS, les coupes sont recouvertes de fluoromount (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et d'une lamelle pour être stockées à 4°C.

Microscopie confocale et quantification :

Les coupes sont imagées au Cecil (Lyon, Université Laennec, Lyon 1, France) par un microscope confocal SP5, au grossissement 20X. Les quantifications sont réalisées à l'aide du logiciel image J et de la macro développée au laboratoire (Cf IV, chapitre 4).

Biocapteurs enzymatiques :

Les biocapteurs sont préparés comme précédemment décrit (Pernot et al., 2008, Vasylieva et al., 2011). Brièvement, les biocapteurs sont des microélectrodes composées d'un fil de platine 90% / iridium 10% de 25 μ m de diamètre (Goodfellow, Huntington, UK) inséré dans une pipette en verre de sorte qu'il dépasse d'environ 100 μ m. Une couche de

polyphénylène diamine (PPD) est ensuite électropolymérisée sur le fil de platine à la pointe de l'électrode à partir d'une solution de m-phénylène diamine (100 mM dans PBS 0.01 M) à 700mV par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl. Enfin une couche d'enzyme est déposée au bout de l'électrode à partir d'une solution concentrée d'enzyme dans du tampon phosphate salin (PBS 0.01M avec 1% de glycérol et 30 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)). Pour détecter le glutamate, nous utilisons la glutamate oxydase, pour la D-sérine, la D-amino acide oxydase (Pernot et al., 2008). Les électrodes contrôles sont produites de la même façon, à partir d'une solution de BSA à 400 mg/ml sans enzyme. L'enzyme ou la BSA déposée sur la pointe de l'électrode est ensuite immobilisé par liaison covalente avec du poly (ethylene glycol) diglycidyl ether (Vasylieva et al., 2011). Les enregistrements ampérométriques sont réalisés grâce à un amplificateur électrochimique VA-10 (NPI electronics, Tamm, Germany) connecté à une carte d'acquisition ITC-18 (Instrutech, Port Washington, NY). Lors des enregistrements, le potentiel est maintenu à 500 mV versus une référence en Ag/AgCl et le courant d'oxydation est échantillonné à 1KHz avec un filtre passe-bas à 20 Hz et une moyenne sur 1000 points donnant une fréquence d'échantillonnage à 1 Hz. Les biocapteurs sont calibrés *in vitro* pour la D-sérine / glutamate et la sérotonine (5-HT) avant et après chaque enregistrement *in vivo*. A la fin de l'expérience, pour estimer la concentration extracellulaire de D-sérine et de glutamate, le courant d'oxydation enregistré par les biocapteurs est divisé par sa sensibilité à 37°C dans une solution standard.

Analyses statistiques :

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm SEM (standart error of the mean). Les tests statistiques sont réalisés sur des échantillons restreints à titre indicatif. Pour la comparaison statistique de deux groupes, un test de student pour moyennes appariées est utilisé (valeur significative $p < 0.05$). Pour la comparaison statistique de trois groupes, un test ANOVA à un facteur a été utilisé suivi d'un test post-hoc LSD de Fisher. Les analyses statistiques utilisent le logiciel SPSS 20.0 pour Windows.

Résultats :

Quantification de la neuroprotection apportée par l'administration de MK-801

Pour étudier l'effet protecteur du MK-801, nous l'avons injecté en intrapéritonéal en même temps que le diazépam chez des rats ayant développé un SE suite à l'injection de pilocarpine, puis nous avons quantifié la densité neuronale. Les quantifications obtenues chez les rats ayant reçu le MK-801 sont comparées à celles obtenues chez des rats contrôles et SE seul (chapitre IV). Les tests statistiques de cette étude ont été effectués à titre indicatif car le nombre de n obtenu jusqu'à présent dans cette étude pour les rats MK-801 n'est pas suffisant.

Dans le cortex et CA1, zones ne présentant pas de perte neuronale suite à un SE, le MK-801 n'apporte aucun changement (Figure 1, C4, D4). En revanche, le cortex piriforme est une zone touchée par une forte perte neuronale, l'administration de MK-801 n'a pas permis de réduire les dommages ($58,64 \pm 17,5$ neurones / mm^2 pour les rats MK-801, $n=3$; $64,1 \pm 6,2$ pour les rats SE, $n=6$ contre $562,5 \pm 32,6$ chez les contrôles, $n=6$; Figure 1, A4). En revanche, le MK-801 a un effet protecteur dans l'amygdale où la densité de neurones est différente de celle obtenue chez les rats SE ($411,9 \pm 69,4$ neurones / mm^2 pour les rats MK-801, $n=3$ contre $214,2 \pm 57,6$ pour les rats SE, $n=6$; Figure 1, B4, $p < 0.05$) ainsi que dans CA3 ($784,13 \pm 133,49$ neurones / mm^2 pour les rats MK-801, $n=3$ contre $690,18 \pm 68,34$ pour les rats SE, $n=6$, Figure 1, E4). En revanche, la densité de neurones est semblable à celle obtenue chez les rats contrôles ($914,5 \pm 51,9$ pour les rats contrôles, $n=6$).

Il est important de noter que dans le cortex piriforme, zone où le MK-801 n'a pas apporté de neuroprotection, le nombre de noyaux totaux est augmenté comme chez les rats SE ($2810,9 \pm 262,5$ noyaux / mm^2 pour les rats traité au MK-801, $n=3$; $2938,1 \pm 304,8$ chez les rats SE, $n=6$ contre $1631,7 \pm 61,1$ chez les contrôles, $n=6$; $p < 0.05$). La neuroprotection apportée par le MK-801 dans l'amygdale et CA3 diminue également le nombre de noyaux totaux, c'est-à-dire probablement la prolifération des cellules gliales observées dans le SE (Avignone et al., 2008).

Ces résultats confirment que la mort neuronale présente dans le *status epilepticus* est au moins en partie due à des processus excitotoxiques NMDA dépendants. Le MK-801 administré deux heures après l'injection de pilocarpine permet de limiter les processus excitotoxiques dans l'amygdale et CA3.

Enregistrement des concentrations extrasynaptiques de D-sérine et de glutamate chez le rat vigile pendant un status epilepticus dans le cortex pariétal.

Après avoir confirmé une composante excitotoxique NMDA-dépendante dans la mort neuronale consécutive au *status epilepticus*, nous nous sommes demandé quel est le ou les ligands responsables de la suractivation des récepteurs NMDA. Nous nous sommes intéressés en particulier au glutamate et à la D-sérine, qui se lient de façon complémentaire aux sous-unités NR2 et NR1 du récepteur NMDA. Pour cela, nous avons implanté des biocapteurs enzymatiques spécifiques de la D-sérine et du glutamate chez des rats vigils. Les biocapteurs sont placés dans deux zones spécifiques. La première est le cortex pariétal où il n'y a pas de perte neuronale excitotoxique 10 jours après le *status epilepticus*, et la deuxième comprend l'amygdale et le cortex piriforme, caractérisés par une forte mort neuronale. Une fois les biocapteurs implantés et stabilisés *in vivo*, le SE est déclenché à l'aide de pilocarpine. Nos biocapteurs nous permettent également d'enregistrer les pointes ondes caractéristiques de l'activité cérébrale épileptique (Fig. 2).

L'enregistrement dans le cortex pariétal ne montre aucun changement des concentrations extracellulaires de D-sérine et de glutamate ni pendant le SE, ni après son arrêt par administration de valium (Figure 2). Le SE est défini comportementalement par des myoclonies et des tremblements. En général, des tremblements continus apparaissent environ

30 min après l'injection de pilocarpine. L'arrêt des manifestations physiques par le valium ne signifie pas forcément l'arrêt des processus excitotoxiques.

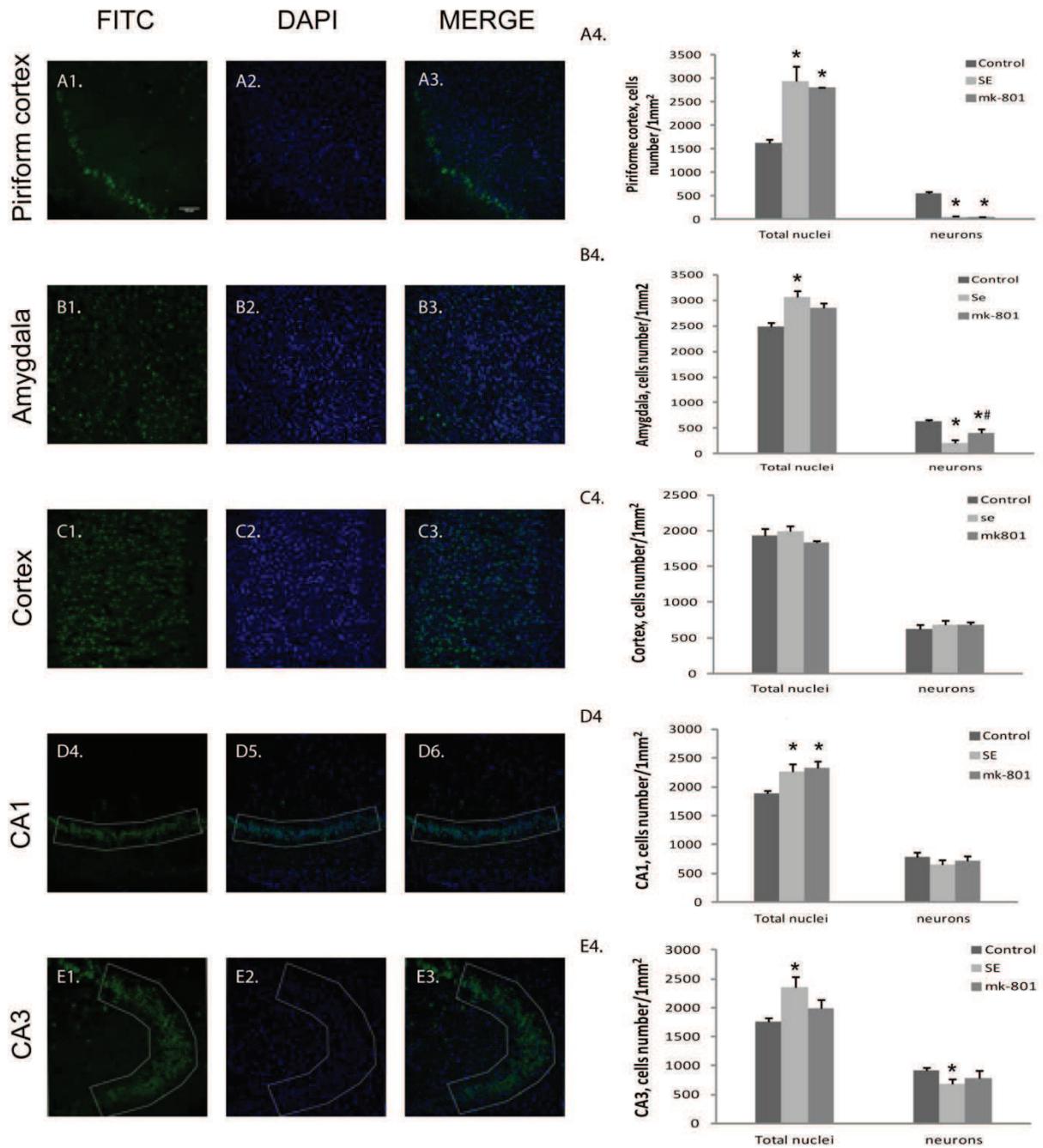


Figure 1 : Quantification de la mort neuronale après une injection d'un antagoniste des récepteurs NMDA : le MK-801.

A1 à A4 : Cortex piriforme (n=3). **A1 :** marquage FITC. **A2 :** marquage DAPI. **A3 :** Superposition. **A4 :** Histogramme représentant le nombre de noyaux totaux chez des rats contrôles, SE, SE+MK-801.

B1 à B4 : Amygdale (n=3). **C1 à C4 :** Cortex (n=3). **D1 à D4 :** CA1 (n=3). **E1 à E4 :** CA3 (n=3). Idem que pour A1 à A4.

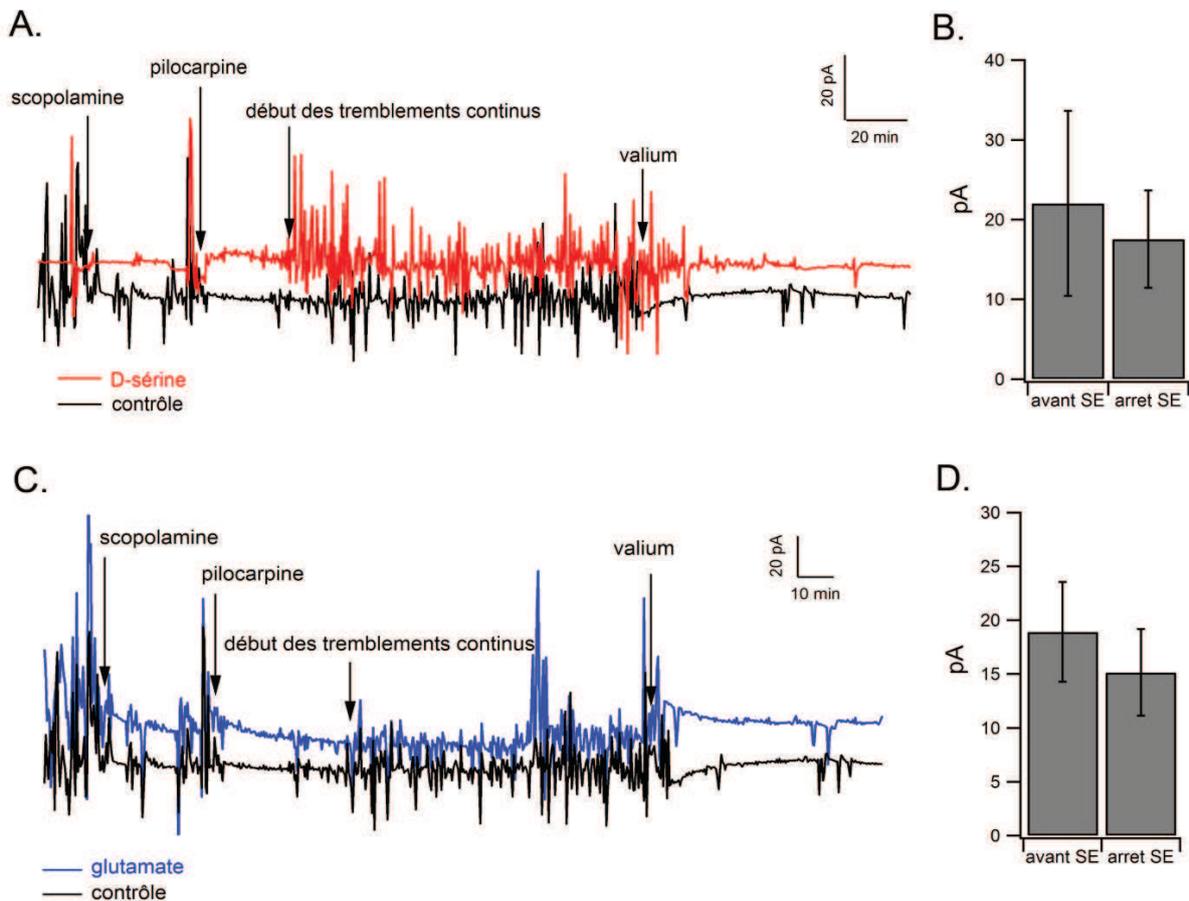


Figure 2 : Enregistrement des concentrations extracellulaires de D-sérine et de glutamate dans le cortex pariétal.

A. Enregistrement de la concentration extracellulaire de la D-sérine (en rouge, n=5) et contrôle (en noir, n=6) dans le cortex pariétal.

B. Histogramme représentant la moyenne \pm SEM des niveaux de D-sérine avant le SE et à son arrêt par le valium.

C. Enregistrement de la concentration extracellulaire de glutamate (en bleu, n=3) et contrôle (en noir, n=6) dans le cortex pariétal.

D. Histogramme représentant la moyenne \pm SEM des niveaux de glutamate avant le SE et à son arrêt par le valium.

Enregistrement des concentrations extrasynaptiques de D-sérine et de glutamate chez le rat vigile pendant un status épilepticus dans le cortex piriforme/amygdale :

La deuxième zone où sont réalisés les enregistrements recouvre le cortex piriforme et l'amygdale et est fortement affectée par une perte neuronale 10 jours après le SE. Dès l'apparition des tremblements continus, une augmentation significative de la concentration extracellulaire de D-sérine a été enregistrée. Cette augmentation se poursuit jusqu'à l'arrêt du

SE par le valium, puis la concentration a diminué lentement pendant les heures suivant l'injection de valium. Cette augmentation de D-sérine est de $43,7 \pm 6,4$ pA ce qui correspond à une augmentation de $2,22 \pm 0,32$ μM ($n=3$, figure 3A, B). Lors du SE, la concentration extracellulaire de D-sérine est ainsi quasiment doublée par rapport à son niveau basal. Concernant la concentration extracellulaire de glutamate, une augmentation est également enregistrée dès l'apparition des tremblements continus. Celle-ci reste élevée pendant 1 heure après l'administration de valium pour ensuite diminuer lentement pendant les heures suivantes. Cette augmentation de glutamate de 65,30 pA correspond à une augmentation de 7,72 μM ($n=2$). Notre équipe a estimé le niveau basal de glutamate à 1,2 μM en extracellulaire. Pendant le SE, ce niveau est donc environ 6 fois plus élevé (figure 3C, D). Lors de nos enregistrements, on voit un arrêt de l'augmentation des concentrations de D-sérine et glutamate concomitant à la disparition des manifestations physiques chez le rat.

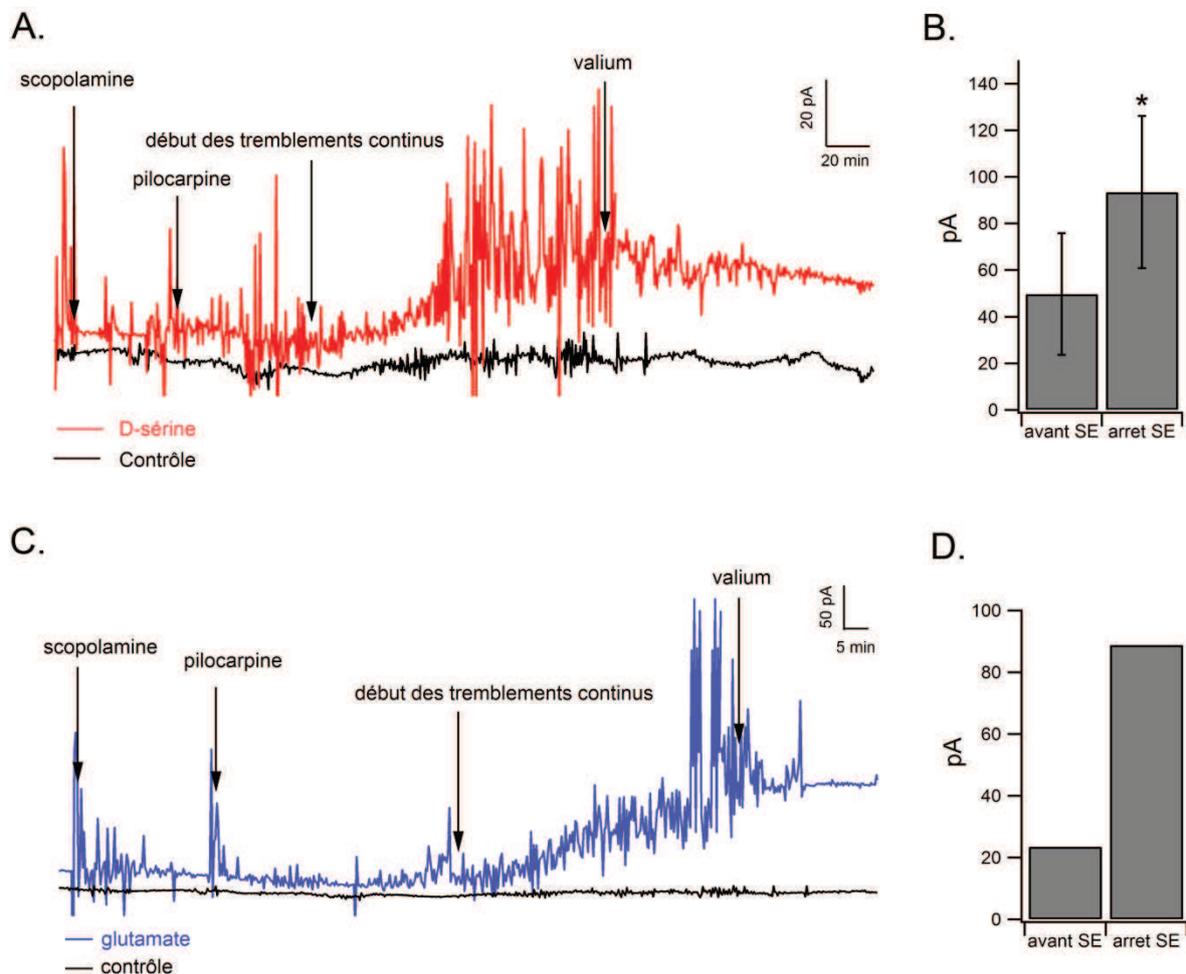


Figure 3 : Enregistrement des concentrations extracellulaires de D-sérine et de glutamate dans le cortex piriforme/amygdale.

A. Enregistrement de la concentration extracellulaire de la D-sérine (en rouge, $n=3$) et contrôle (en noir, $n=1$) dans le cortex piriforme/amygdale.

- B. Histogramme représentant la moyenne \pm SEM des niveaux de D-sérine avant le SE et à son arrêt par le valium.
- C. Enregistrement de la concentration extracellulaire de glutamate (en bleu, n=2) et contrôle (en noir, n=1) dans le cortex piriforme/amygdale.
- D. Histogramme représentant la moyenne des niveaux de glutamate avant le SE et à son arrêt par le valium.

Discussion :

Dans cette étude, nous avons montré que le MK-801 a un effet neuroprotecteur dans l'amygdale et CA3. Il limite la perte neuronale due à des processus excitotoxiques. L'effet protecteur du MK-801 dans ces deux zones nous informe que les processus excitotoxiques sont encore en cours dans ces deux zones deux heures après l'administration de valium. Scorza et al. (2009) ont montré que les dommages excitotoxiques n'apparaissent pas en même temps dans les différentes aires du cerveau. Deux hypothèses peuvent être émises, on peut soit supposer que les processus conduisant aux dommages de l'amygdale et de CA3 sont plus tardifs ou plus étalés dans le temps que ceux du cortex piriforme, terminés au moment de l'injection du valium. Pour confirmer cela, des injections de MK-801 à d'autres temps plus tardifs sont nécessaires. Soit d'autres mécanismes non excitotoxiques peuvent être responsables de la mort neuronale dans le cortex piriforme et donc insensibles à l'action du MK-801. Le MK-801 apporte une neuroprotection dans un premier temps, en revanche dans un second temps, des équipes ont montré qu'il exacerbe l'excitotoxicité (Pohl et al., 1999, Ikonomidou and Turski, 2002). Réaliser des injections de MK-801 à d'autres temps, de plus en plus éloignés de l'injection de valium, peut également être intéressant pour déterminer la fenêtre temporelle pendant laquelle le MK-801 est protecteur et ainsi adapter de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives concernées par l'excitotoxicité.

Les premiers résultats obtenus chez les rats vigils montrent que les concentrations extracellulaires de D-sérine et de glutamate augmentent dès l'apparition du SE et jusqu'à l'arrêt du SE par l'injection de valium. Ces données montrent une implication dans l'excitotoxicité non seulement du glutamate, mais également de la D-sérine. Cela confirme *in vivo* les études de Shleper et al. (2005) et Papouin et al. (2012) réalisées sur tranches d'hippocampe. Harai et al. (2012) ont montré que l'absence de la sérine racémase chez des souris KO a un effet anti convulsivant. Suite à un SE, des souris contrôles ont une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate et de D-sérine tandis que chez les souris KO pour la SR, la D-sérine reste à des niveaux très faibles qui empêchent la suractivation des récepteurs NMDA. Ainsi, l'augmentation de la concentration ambiante de D-sérine pourrait potentialiser l'action excitotoxique du glutamate.

L'origine des récepteurs NMDA responsables de l'excitotoxicité est actuellement controversée. De nombreuses études montrent que les récepteurs NMDA extrasynaptiques sont responsables de l'excitotoxicité par activation de voies de signalisation pro-apoptotique tandis que les récepteurs NMDA synaptiques activent des voies de signalisation anti-

apoptotiques et conduisent à la survie neuronale (Hardingham and Bading, 2003, 2010). Récemment, Papouin et al. (2012) ont montré que l'excitotoxicité est médiée par les récepteurs NMDA synaptiques. Notre étude ne permet pas de déterminer quels sont les récepteurs NMDA responsables de l'excitotoxicité. L'augmentation des concentrations de D-sérine et de glutamate enregistrée en extrasynaptique peuvent avoir deux origines possibles. Elles peuvent être soit libérées directement dans l'espace extracellulaire et ainsi activer les récepteurs extrasynaptiques qui seraient donc responsables de l'excitotoxicité. En revanche, elles peuvent aussi provenir d'un spillover provenant de la fente synaptique et dans ce cas les récepteurs synaptiques sont également activés. Les EC50 obtenus *in vitro* concernant l'affinité de la D-sérine pour les récepteurs extrasynaptiques sont faibles et surprenantes (0.15 μM , Priestley et al., 1995) par rapport à nos données obtenues *in vivo* déterminant un niveau basal de D-sérine extrasynaptique de 2.3 μM dans le cortex et 2.8 μM dans l'hippocampe (Pernot et al., 2012). Si l'on se réfère aux EC50, toutes ces concentrations obtenues *in vivo* sont considérées comme saturantes (Cf introduction B, 1.4). A priori une augmentation de D-sérine en extrasynaptique ne doit avoir aucun effet puisque d'après les valeurs obtenues pour les EC50 *in vitro*, le site est déjà saturé par la concentration ambiante de D-sérine.

Nos résultats montrent une implication de la D-sérine et du glutamate dans le SE. L'épilepsie observée chez la plupart des patients se caractérise typiquement par des crises de quelques secondes à 5 min. Dans ce type de pathologie, une diminution de la taille de l'hippocampe est observée chez des patients épileptiques depuis de nombreuses années et présentant des crises répétées, et pourrait être liée à des agressions excitotoxiques cumulées au cours de la vie du patient. Wilson et al. (1996) ont montré une augmentation du glutamate extracellulaire chez des patients épileptiques depuis de nombreuses années et fréquemment concernés par une sclérose de l'hippocampe. Il pourrait donc être intéressant de provoquer des crises d'épilepsie plus courtes chez des rats vigils et d'enregistrer les concentrations de D-sérine afin de déterminer si la D-sérine est uniquement impliquée dans le SE et les processus excitotoxiques ou également dans les crises d'épilepsie.

Conclusion :

Notre étude montre que le SE chez le rat provoque une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate et de D-sérine dans l'amygdale et le cortex piriforme, deux zones fortement lésées 10 jours après le SE. Le blocage des récepteurs NMDA par le MK-801 suffit à limiter la mort neuronale produite par le SE dans l'amygdale. Ces données confirment l'implication de mécanismes excitotoxiques dépendant du glutamate et de la D-sérine dans cette pathologie.

Conclusion et perspectives

Pendant mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'étude de la régulation de la concentration extracellulaire de la D-sérine et à son implication dans l'excitotoxicité.

Dans la première partie de mon travail concernant les mécanismes de régulation de la D-sérine, nous avons tout d'abord montré grâce à nos biocapteurs enzymatiques et à des techniques d'HPLC, que suite à une injection intrapéritonéale de D-sérine, les concentrations intracellulaires et extracellulaires de D-sérine sont presque doublées bien que la D-sérine diffuse faiblement et lentement à travers la barrière hématoencéphalique. Des stocks intracellulaires de D-sérine sont présents et contiennent plus de 99% de la D-sérine totale du cerveau. Ensuite nous avons mis en évidence, *in vivo*, le rôle des transporteurs ASC dans la recapture et la libération de la D-sérine extracellulaire. Les sous types Asc-1 et ASCT2 contribuent significativement à l'élimination de la D-sérine du milieu extracellulaire, indiquant que les neurones et les astrocytes participent ensemble à la recapture de D-sérine. En revanche, seul Asc-1 a la capacité de libérer de la D-sérine, impliquant une libération de D-sérine par transporteur uniquement neuronale. Puis le rôle de la DAAO et de la sérine racémase dans la dégradation *in vivo* de la D-sérine a été étudié. Nous avons déterminé que la DAAO est responsable de la dégradation de la D-sérine dans le cervelet tandis que la sérine racémase dégrade la D-sérine dans le cortex par son activité α,β -éliminase.

La seconde partie de mon travail de thèse était consacrée à l'implication de la D-sérine dans l'excitotoxicité. Nous avons mis au point une méthode de quantification de la densité neuronale. Grâce à cette méthode, nous avons quantifié précisément la mort neuronale dans un modèle de *status epilepticus* chez le rat et identifié une composante excitotoxique sensible à l'administration d'antagonistes NMDA. Puis nous avons enregistré en temps réel les concentrations extracellulaires de D-sérine et de glutamate chez le rat vigile pendant un SE et observé une augmentation de la concentration de D-sérine et de glutamate extracellulaire dans une zone fortement lésée par des processus excitotoxiques, le cortex piriforme/amygdale. En revanche, dans le cortex pariétal où il n'y a pas de perte neuronale, les concentrations de ces deux transmetteurs ne sont pas modifiées. Ces résultats indiquent que la D-sérine participe *in vivo* aux processus excitotoxiques au même titre que le glutamate.

Au vu des résultats que nous avons apportés concernant la régulation de la D-sérine extracellulaire et de ceux présents dans la littérature, on peut proposer un schéma récapitulatif de sa régulation (figure 1). Une fois synthétisée par la sérine racémase au niveau neuronal, la D-sérine est libérée dans l'espace extracellulaire par le transporteur Asc-1. Elle peut ensuite être recaptée soit par Asc-1 soit par ASCT2. Asc-1 est un transporteur neuronal, on peut supposer qu'en présence de trop forte concentration de D-sérine extracellulaire, Asc-1 recapte la D-sérine pour permettre sa dégradation par la sérine racémase qui va fonctionner en éliminase dans les neurones du télencéphale. En revanche la localisation d'ASCT2 est encore actuellement controversée. Sa localisation est identifiée comme neuronale et/ ou astrocytaire. On peut proposer que les transporteurs ASCT2 astrocytaires permettent de recapter la D-sérine présente dans l'espace extracellulaire pour permettre son stockage intracellulaire dans le télencéphale ou sa dégradation par la DAAO dans le cervelet. Les transporteurs ASCT2 neuronaux peuvent avoir le même but qu'Asc-1, réguler la quantité de D-sérine présente en permettant sa dégradation. En effet, en présence d'une concentration élevée de D-sérine, l'activité de la sérine racémase pourrait être préférentiellement de type α,β -éliminase et permettre le retour à des niveaux de D-sérine physiologiques. Cependant, les mécanismes

permettant de réguler les deux activités sérine racémase et α,β -éliminase pour la même enzyme restent encore mal connus. La présence de stock intracellulaire astrocytaire supporte la fonction de la D-sérine comme transmetteur pouvant moduler la transmission synaptique et être mobilisé rapidement. L'ensemble de ces résultats montrent que la D-sérine extracellulaire est régulée par des mécanismes complexes de transport et de dégradation. Ces mécanismes pourraient être dysrégulés au cours d'agressions cérébrales comme le *status épilepticus*, menant ainsi à des concentrations anormalement élevées de D-sérine qui contribuent à l'excitotoxicité.

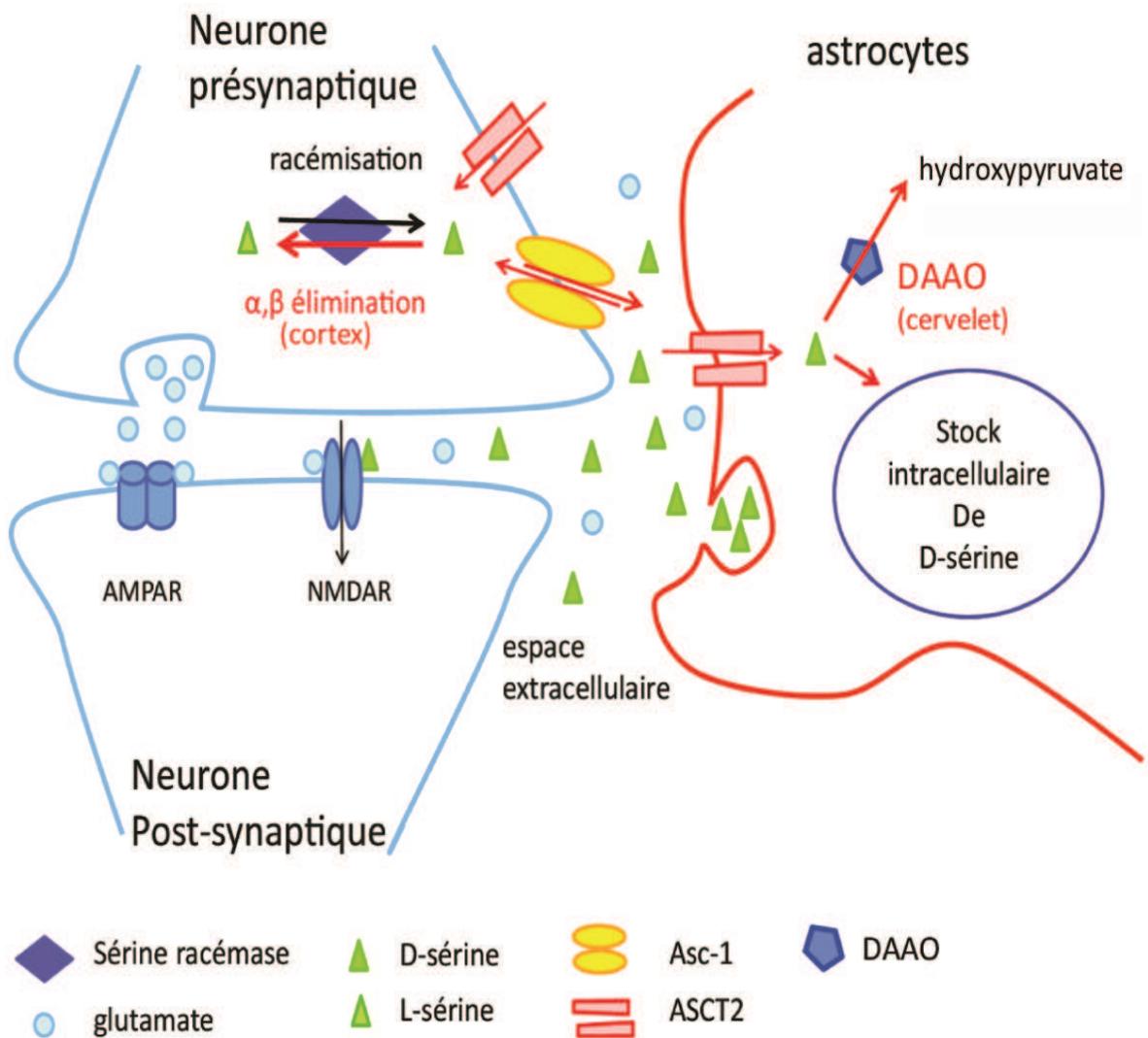


Figure 1 : Schéma récapitulatif de la régulation de la D-sérine extracellulaire.

Nous avons montré que la D-sérine joue un rôle actif dans l'excitotoxicité présente dans le *status épilepticus*. Ces résultats permettent d'envisager de nouveaux traitements contre l'excitotoxicité. Bloquer la D-sérine dans le *status épilepticus* permettrait de prévenir une

partie des lésions. Il est envisageable de bloquer la libération de D-sérine en inhibant sa libération par le transporteur Asc-1. Deuxièmement, on peut imaginer le développement de traitement permettant une diminution de la concentration extracellulaire de D-sérine en favorisant l'activité éliminase de la sérine racémase. Il est possible que de nombreuses pathologies impliquant des processus excitotoxiques impliquent aussi une augmentation de la concentration de D-sérine. Au contraire, la schizophrénie semble caractérisée par une diminution de la concentration de D-sérine. Nos résultats apportent une meilleure compréhension des régulations de la D-sérine et permettent d'envisager et/ou de réadapter des traitements pharmacologiques. Nos données montrant une dégradation de la D-sérine par la sérine racémase dans le cortex offrent de nouvelles possibilités pour le traitement de la schizophrénie. La D-sérine est néphrotoxique utilisée à de forte dose. On peut envisager de donner à la fois des inhibiteurs de la sérine racémase et de la D-sérine par traitement oral. Cela permettrait de diminuer les doses de D-sérine à administrer aux patients.

Dans le cadre de cette thèse, les microbiocapteurs implantables ont fourni une méthodologie innovante permettant de suivre en temps réel les concentrations extracellulaires de D-sérine avec une résolution temporelle proche de la seconde. Nous avons pu ainsi confirmer *in vivo* plusieurs mécanismes précédemment identifiés *in vitro* avec des cultures cellulaires ou des tranches de cerveau : la recapture de D-sérine par les transporteurs Asc-1 et ASCT2, la libération de D-sérine par Asc-1, et la dégradation de D-sérine par la sérine racémase. En revanche, nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence une libération rapide de D-sérine évoquée par un stimulus physiologique compatible avec l'exocytose. Par exemple, nous avons testés la stimulation électrique de la voie perforante avec un enregistrement dans le gyrus denté et n'avons jamais détecté la libération de D-sérine prédite par certains modèles actuels (Oliet and Mothet, 2009, Henneberger et al., 2010) qui proposent une libération rapide de D-sérine astrocytaire par exocytose en réponse à l'activité synaptique glutamatergique. Il est possible que cette libération mette en jeu des quantités infimes de D-sérine confinées dans la fente synaptique mais indétectables par nos biocapteurs extrasynaptiques. Le fait que les mécanismes physiologiques proposés sur la base de résultats obtenus *in vitro* ne soient pas systématiquement vérifiés *in vivo* justifie notre approche expérimentale fondée sur l'expérimentation *in vivo* par des microbiocapteurs implantables. Une seconde étape extrêmement importante est la transposition des résultats obtenus chez le rongeur à l'homme. Actuellement cela est encore une difficulté majeure. Un exemple de cette difficulté est notamment apparu lors du développement d'inhibiteurs de la DAAO pour le traitement de la schizophrénie. Il a été mis en évidence que la DAAO de rat est différente de la DAAO humaine et qu'elles ne possèdent pas les mêmes affinités pour les inhibiteurs. Cela souligne les limites de l'utilisation des rongeurs pour développer des traitements destinées à soigner les humains. Il est important de ne pas oublier cela lors du développement et de la validation de traitements destinés à l'homme.

Bien connaître la régulation de la D-sérine *in vivo* est extrêmement important pour comprendre les dysfonctionnements présents dans les pathologies du système nerveux central. Un des points forts de nos études est que grâce aux biocapteurs enzymatiques nous pouvons étudier *in vivo* ce qui jusqu'à présent n'a été étudié que *in vitro* ou *ex vivo*. Pour l'instant nous sommes limités à l'enregistrement des concentrations extrasynaptiques et d'une seule molécule à la fois. Notre laboratoire travaille actuellement à développer des biocapteurs

permettant l'enregistrement simultané de plusieurs molécules, par rapport à la microdialyse cela permettrait de limiter les dégâts provoqués par l'insertion de la sonde. Pour mieux s'affranchir des lésions tissulaires provoquées par l'implantation des biocapteurs, il serait intéressant de développer des biocapteurs encore plus petits. En revanche, vu la taille de la fente synaptique (quelques nm) il est probable que les concentrations de neurotransmetteurs à la synapse restent hors d'atteinte des biocapteurs électrochimiques. Pour avoir une vision complète de la régulation des neurotransmetteurs et de leur origine synaptique ou extrasynaptique lors de diverses situations physiologiques ou pathologiques, il est nécessaire d'avoir recours à une approche pluridisciplinaire impliquant plusieurs techniques différentes.

Pendant mon travail de thèse, je me suis intéressée principalement à la D-sérine. Le récepteur NMDA possède également un autre co-agoniste, la glycine. Lors de notre étude de l'excitotoxicité dans le *status epilepticus*, nous avons enregistré les concentrations extracellulaires de D-sérine et de glutamate. Des enregistrements de la concentration extracellulaire de glycine *in vivo* permettraient de compléter cette étude en définissant le rôle des trois agonistes des récepteurs NMDA dans les processus excitotoxiques. Des capteurs à glycine sensibles et spécifiques ne sont pas encore disponibles. Nos essais préliminaires avec la glycine oxydase n'ont pas permis de développer des capteurs stables. Mais la mise au point de biocapteurs de glycine reste un objectif de long terme.

Actuellement nous sommes capables d'enregistrer pendant 24h en continu sans perte de signal du biocapteur enzymatique. Ces biocapteurs permettant l'enregistrement de plusieurs molécules extracellulaires sont envisagés pour être utilisés à long terme chez des patients dans le coma atteints de traumatismes crâniens sévères ou d'hémorragie sous-arachnoïdienne. Il devient alors important de pouvoir définir quelle est la durée de la stabilité de ces biocapteurs *in vivo*. La biocompatibilité devra également être étudiée et certains éléments de leur composition devront être remplacés comme par exemple la poly-*m*-phénylenediamine qui est toxique pour l'homme. Une des étapes les plus difficiles pour passer aux enregistrements chez l'humain sera de trouver une méthode de stérilisation ne dénaturant pas l'enzyme. Les procédures de stérilisation envisagées sont l'irradiation par les rayons γ ou par faisceau d'électron. Un des buts est également d'industrialiser ces biocapteurs. Actuellement nos biocapteurs sont fabriqués manuellement, l'industrialisation permettrait d'avoir une disponibilité, une reproductibilité et une accessibilité plus grande de cette technique par la communauté scientifique.

Références bibliographiques

- Adage T, Trillat AC, Quattropiani A, Perrin D, Cavarec L, Shaw J, Guerassimenko O, Giachetti C, Greco B, Chumakov I, Halazy S, Roach A, Zaratin P (2008) In vitro and in vivo pharmacological profile of AS057278, a selective d-amino acid oxidase inhibitor with potential anti-psychotic properties. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 18:200-214.
- Amico-Ruvio SA, Paganelli MA, Myers JM, Popescu GK (2012) Ifenprodil Effects on GluN2B-containing Glutamate Receptors. *Molecular pharmacology*.
- Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M (1993) Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochemical and biophysical research communications* 197:1267-1276.
- Arnold G, Liscum L, Holtzman E (1979) Ultrastructural localization of D-amino acid oxidase in microperoxisomes of the rat nervous system. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 27:735-745.
- Aroniadou-Anderjaska V, Fritsch B, Qashu F, Braga MF (2008) Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res* 78:102-116.
- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14:10-18.
- Avignone E, Ulmann L, Levavasseur F, Rassendren F, Audinat E (2008) Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J Neurosci* 28:9133-9144.
- Bado P, Madeira C, Vargas-Lopes C, Moulin TC, Wasilewska-Sampaio AP, Maretti L, de Oliveira RV, Amaral OB, Panizzutti R (2011) Effects of low-dose D-serine on recognition and working memory in mice. *Psychopharmacology* 218:461-470.
- Balu DT, Coyle JT (2011) Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35:848-870.
- Barger SW, Basile AS (2001) Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *J Neurochem* 76:846-854.
- Baruah S, Waziri R, Hegwood TS, Mallis LM (1991) Plasma serine in schizophrenics and controls measured by gas chromatography-mass spectrometry. *Psychiatry Res* 37:261-270.
- 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.
- Bauer D, Hamacher K, Broer S, Pauleit D, Palm C, Zilles K, Coenen HH, Langen KJ (2005) Preferred stereoselective brain uptake of d-serine--a modulator of glutamatergic neurotransmission. *Nuclear medicine and biology* 32:793-797.
- Baumgart F, Mancheno JM, Rodriguez-Crespo I (2007) Insights into the activation of brain serine racemase by the multi-PDZ domain glutamate receptor interacting protein, divalent cations and ATP. *FEBS J* 274:4561-4571.
- 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.
- Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2006) Lamina-specific abnormalities of AMPA receptor trafficking and signaling molecule transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Synapse* 60:585-598.
- Benneyworth MA, Li Y, Basu AC, Bolshakov VY, Coyle JT (2012) Cell selective conditional null mutations of serine racemase demonstrate a predominate localization in cortical glutamatergic neurons. *Cellular and molecular neurobiology* 32:613-624.
- Benveniste H, Diemer NH (1987) Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol* 74:234-238.

- Benzel I, Kew JN, Viknaraja R, Kelly F, de Belleruche J, Hirsch S, Sanderson TH, Maycox PR (2008) Investigation of G72 (DAOA) expression in the human brain. *BMC psychiatry* 8:94.
- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, Wold JF, Roe AT, Stranna A, Santello M, Bouvier D, Ottersen OP, Volterra A, Gundersen V (2011) Immunogold Detection of L-glutamate and D-serine in Small Synaptic-Like Microvesicles in Adult Hippocampal Astrocytes. *Cereb Cortex*.
- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, Wold JF, Roe AT, Stranna A, Santello M, Bouvier D, Ottersen OP, Volterra A, Gundersen V (2012) Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb Cortex* 22:1690-1697.
- Bhatt JM, Prakash A, Suryavanshi PS, Dravid SM (2012) Effect of Ifenprodil on GluN1/GluN2B NMDA Receptor Gating. *Molecular pharmacology*.
- Binder DK, Steinhauser C (2006) Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* 54:358-368.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A (2010) Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production. *J Neurosci* 30:15927-15942.
- Borland LM, Shi G, Yang H, Michael AC (2005) Voltammetric study of extracellular dopamine near microdialysis probes acutely implanted in the striatum of the anesthetized rat. *J Neurosci Methods* 146:149-158.
- Bozzi Y, Casarosa S, Caleo M (2012) Epilepsy as a neurodevelopmental disorder. *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation* 3:19.
- Brandt C, Potschka H, Loscher W, Ebert U (2003) N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 118:727-740.
- Broer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Broer S (1999) The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem* 73:2184-2194.
- Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience* 27:723-749.
- Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA (1988) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res* 472:77-101.
- Burnet PW, Hutchinson L, von Hesling M, Gilbert EJ, Brandon NJ, Rutter AR, Hutson PH, Harrison PJ (2008) Expression of D-serine and glycine transporters in the prefrontal cortex and cerebellum in schizophrenia. *Schizophr Res* 102:283-294.
- Calcia MA, Madeira C, Alheira FV, Silva TC, Tannos FM, Vargas-Lopes C, Goldenstein N, Brasil MA, Ferreira ST, Panizzutti R (2012a) Plasma levels of D-serine in Brazilian individuals with schizophrenia. *Schizophr Res*.
- Calcia MA, Madeira C, Alheira FV, Silva TC, Tannos FM, Vargas-Lopes C, Goldenstein N, Brasil MA, Ferreira ST, Panizzutti R (2012b) Plasma levels of D-serine in Brazilian individuals with schizophrenia. *Schizophr Res* 142:83-87.
- Cardoso A, Madeira MD, Paula-Barbosa MM, Lukoyanov NV (2008) Retrosplenial granular b cortex in normal and epileptic rats: a stereological study. *Brain Res* 1218:206-214.
- Carone FA, Ganote CE (1975) D-serine nephrotoxicity. The nature of proteinuria, glucosuria, and aminoaciduria in acute tubular necrosis. *Archives of pathology* 99:658-662.
- Carone FA, Nakamura S, Goldman B (1985) Urinary loss of glucose, phosphate, and protein by diffusion into proximal straight tubules injured by D-serine and maleic acid. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 52:605-610.
- Carvalho AS, Torres LB, Persike DS, Fernandes MJ, Amado D, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Cavalheiro EA, da Silva AV (2011) Neuroprotective effect of pyruvate and oxaloacetate during pilocarpine induced status epilepticus in rats. *Neurochem Int* 58:385-390.

- Caudle WM, Zhang J (2009) Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp Neurol* 220:230-233.
- Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. *Italian journal of neurological sciences* 16:33-37.
- Chapman AG, Elwes RD, Millan MH, Polkey CE, Meldrum BS (1996) Role of glutamate and aspartate in epileptogenesis; contribution of microdialysis studies in animal and man. *Epilepsy research Supplement* 12:239-246.
- Chaturvedi RK, Beal MF (2008) Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147:395-412.
- Chen HS, Lipton SA (1997) Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *J Physiol* 499 (Pt 1):27-46.
- Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, Lipton SA (1992) Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 12:4427-4436.
- Chen HS, Wang YF, Rayudu PV, Edgecomb P, Neill JC, Segal MM, Lipton SA, Jensen FE (1998) Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 86:1121-1132.
- Chen JW, Naylor DE, Wasterlain CG (2007) Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum* 186:7-15.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience* 13:171-182.
- Chouinard ML, Gaitan D, Wood PL (1993) Presence of the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor agonist, D-serine, in human temporal cortex: comparison of normal, Parkinson, and Alzheimer tissues. *J Neurochem* 61:1561-1564.
- 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 FP, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, 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, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, 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.
- Ciriacks CM, Bowser MT (2004) Monitoring D-serine dynamics in the rat brain using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Anal Chem* 76:6582-6587.
- Clifford DB, Zorumski CF, Olney JW (1989) Ketamine and MK-801 prevent degeneration of thalamic neurons induced by focal cortical seizures. *Exp Neurol* 105:272-279.
- Collombet JM, Carpentier P, Baille V, Four E, Bernabe D, Burckhart MF, Masqueliez C, Baubichon D, Lallement G (2006a) Neuronal regeneration partially compensates the delayed neuronal cell death observed in the hippocampal CA1 field of soman-poisoned mice. *Neurotoxicology* 27:201-209.
- Collombet JM, Masqueliez C, Four E, Burckhart MF, Bernabe D, Baubichon D, Lallement G (2006b) Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. *Neurosci Lett* 398:337-342.
- Corrigan JJ (1969) D-amino acids in animals. *Science* 164:142-149.

- Covolan L, Mello LE (2006) Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 39:915-924.
- Coyle JT, Tsai G (2004) NMDA receptor function, neuroplasticity, and the pathophysiology of schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 59:491-451.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* 11:327-335.
- Czeredys M, Mysiorek C, Kulikova N, Samluk L, Berezowski V, Cecchelli R, Nalecz KA (2008) A polarized localization of amino acid/carnitine transporter B(0,+)⁺ (ATB(0,+)) in the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 376:267-270.
- Danysz W, Parsons CG (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacological reviews* 50:597-664.
- Davies KG, Hermann BP, Dohan FC, Jr., Foley KT, Bush AJ, Wyler AR (1996) Relationship of hippocampal sclerosis to duration and age of onset of epilepsy, and childhood febrile seizures in temporal lobectomy patients. *Epilepsy Res* 24:119-126.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6368-6371.
- Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM (1996) Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 16:2479-2487.
- De Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H (2002) Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14542-14547.
- De Miranda J, Santoro A, Engelender S, Wolosker H (2000) Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis. *Gene* 256:183-188.
- Deitmer JW, Broer A, Broer S (2003) Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J Neurochem* 87:127-135.
- Dempsey RJ, Baskaya MK, Dogan A (2000) Attenuation of brain edema, blood-brain barrier breakdown, and injury volume by ifenprodil, a polyamine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, after experimental traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery* 47:399-404; discussion 404-396.
- DeVito LM, Balu DT, Kanter BR, Lykken C, Basu AC, Coyle JT, Eichenbaum H (2011) Serine racemase deletion disrupts memory for order and alters cortical dendritic morphology. *Genes, brain, and behavior* 10:210-222.
- Dick O, Bading H (2010) Synaptic activity and nuclear calcium signaling protect hippocampal neurons from death signal-associated nuclear translocation of FoxO3a induced by extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 285:19354-19361.
- Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, Konig I, Landwehr M, Kreutz M, Smalla KH, Richter K, Landgraf P, Reissner C, Boeckers TM, Zuschratter W, Spilker C, Seidenbecher CI, Garner CC, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2008) Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS biology* 6:e34.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- do Nascimento AL, Dos Santos NF, Campos Pelagio F, Aparecida Teixeira S, de Moraes Ferrari EA, Langone F (2012) Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1470:98-110.
- Driscoll I, Hamilton DA, Petropoulos H, Yeo RA, Brooks WM, Baumgartner RN, Sutherland RJ (2003) The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cereb Cortex* 13:1344-1351.
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15:6377-6388.

- Dumin E, Bendikov I, Foltyn VN, Misumi Y, Ikehara Y, Kartvelishvily E, Wolosker H (2006) Modulation of D-serine levels via ubiquitin-dependent proteasomal degradation of serine racemase. *J Biol Chem* 281:20291-20302.
- Dun Y, Mysona B, Itagaki S, Martin-Studdard A, Ganapathy V, Smith SB (2007) Functional and molecular analysis of D-serine transport in retinal Muller cells. *Exp Eye Res* 84:191-199.
- Dunlop DS, Neidle A (1997) The origin and turnover of D-serine in brain. *Biochemical and biophysical research communications* 235:26-30.
- Dunlop DS, Neidle A (2005) Regulation of serine racemase activity by amino acids. *Brain Res Mol Brain Res* 133:208-214.
- Dunlop DS, Neidle A, McHale D, Dunlop DM, Lajtha A (1986) The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochemical and biophysical research communications* 141:27-32.
- Egerton A, Reid L, McGregor S, Cochran SM, Morris BJ, Pratt JA (2008) Subchronic and chronic PCP treatment produces temporally distinct deficits in attentional set shifting and prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology* 198:37-49.
- Esposito S, Pristera A, Maresca G, Cavallaro S, Felsani A, Florenzano F, Manni L, Ciotti MT, Pollegioni L, Borsello T, Canu N (2012) Contribution of serine racemase/d-serine pathway to neuronal apoptosis. *Aging cell* 11:588-598.
- Ferraris D, Duvall B, Ko YS, Thomas AG, Rojas C, Majer P, Hashimoto K, Tsukamoto T (2008) Synthesis and biological evaluation of D-amino acid oxidase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 51:3357-3359.
- Fisher G, Lorenzo N, Abe H, Fujita E, Frey WH, Emory C, Di Fiore MM, A DA (1998) Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. *Amino acids* 15:263-269.
- Fitzjohn SM, Morton RA, Kuenzi F, Rosahl TW, Shearman M, Lewis H, Smith D, Reynolds DS, Davies CH, Collingridge GL, Seabrook GR (2001) Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. *J Neurosci* 21:4691-4698.
- Foltyn VN, Bendikov I, De Miranda J, Panizzutti R, Dumin E, Shleper M, Li P, Toney MD, Kartvelishvily E, Wolosker H (2005) Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an alpha,beta-elimination activity. *J Biol Chem* 280:1754-1763.
- Fossat P, Turpin FR, Sacchi S, Dulong J, Shi T, Rivet JM, Sweedler JV, Pollegioni L, Millan MJ, Olié SH, Mothet JP (2012) Glial D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 22:595-606.
- Foster AC, Willis CL, Tridgett R (1990) Protection Against N-methyl-D-aspartate Receptor-Mediated Neuronal Degeneration In Rat Brain by 7-chlorokynurenate and 3-amino-1-hydroxypyrrolid-2-one, Antagonists at The Allosteric Site for Glycine. *Eur J Neurosci* 2:270-277.
- Frattini LF, Piubelli L, Sacchi S, Molla G, Pollegioni L (2011) Is rat an appropriate animal model to study the involvement of D-serine catabolism in schizophrenia? Insights from characterization of D-amino acid oxidase. *FEBS J* 278:4362-4373.
- Fuchs SA, Dorland L, de Sain-van der Velden MG, Hendriks M, Klomp LW, Berger R, de Koning TJ (2006) D-serine in the developing human central nervous system. *Annals of neurology* 60:476-480.
- Fuchs SA, Peeters-Scholte CM, de Barse MM, Roeleveld MW, Klomp LW, Berger R, de Koning TJ (2012) Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonists D-serine and glycine in global ischemia: a potential novel treatment target for perinatal asphyxia. *Amino acids* 43:355-363.
- Fuerst D, Shah J, Kupsky WJ, Johnson R, Shah A, Hayman-Abello B, Ergh T, Poore Q, Canady A, Watson C (2001) Volumetric MRI, pathological, and neuropsychological progression in hippocampal sclerosis. *Neurology* 57:184-188.
- Fujikawa DG (1995) Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36:186-195.

- Fujikawa DG (1996) The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 725:11-22.
- Fujikawa DG (2005) Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy & behavior : E&B* 7 Suppl 3:S3-11.
- Fujikawa DG, Daniels AH, Kim JS (1994) The competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 protects against status epilepticus-induced neuronal damage. *Epilepsy Res* 17:207-219.
- Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y (2000a) Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 275:9690-9698.
- Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y (2000b) Identification and characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 275:9690-9698.
- Fukushima T, Kawai J, Imai K, Toyo'oka T (2004) Simultaneous determination of D- and L-serine in rat brain microdialysis sample using a column-switching HPLC with fluorimetric detection. *Biomed Chromatogr* 18:813-819.
- Ganote CE, Peterson DR, Carone FA (1974) The nature of D-serine--induced nephrotoxicity. *The American journal of pathology* 77:269-282.
- Gao G, Dou QP (2000) N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *Journal of cellular biochemistry* 80:53-72.
- Gelfin E, Kaufman Y, Korn-Lubetzki I, Bloch B, Kremer I, Javitt DC, Heresco-Levy U (2011) D-serine adjuvant treatment alleviates behavioural and motor symptoms in Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 1-7.
- Gelfin E, Kaufman Y, Korn-Lubetzki I, Bloch B, Kremer I, Javitt DC, Heresco-Levy U (2012) D-serine adjuvant treatment alleviates behavioural and motor symptoms in Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:543-549.
- Gladding CM, Raymond LA (2011) Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and cellular neurosciences* 48:308-320.
- 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.
- Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences* 32:37-43.
- Goltsov AY, Loseva JG, Andreeva TV, Grigorenko AP, Abramova LI, Kaleda VG, Orlova VA, Moliaka YK, Rogaev EI (2006) Polymorphism in the 5'-promoter region of serine racemase gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11:325-326.
- Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of cell science* 118:3091-3102.
- Greenamyre JT, Eller RV, Zhang Z, Ovadia A, Kurlan R, Gash DM (1994) Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Annals of neurology* 35:655-661.
- Grewer C, Grabsch E (2004) New inhibitors for the neutral amino acid transporter ASCT2 reveal its Na⁺-dependent anion leak. *J Physiol* 557:747-759.
- Groc L, Bard L, Choquet D (2009) Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158:4-18.
- Groc L, Choquet D (2006) AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell and tissue research* 326:423-438.
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, Choquet D (2006) NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18769-18774.

- Habl G, Zink M, Petroianu G, Bauer M, Schneider-Axmann T, von Wilmsdorff M, Falkai P, Henn FA, Schmitt A (2009) Increased D-amino acid oxidase expression in the bilateral hippocampal CA4 of schizophrenic patients: a post-mortem study. *J Neural Transm* 116:1657-1665.
- Halene TB, Ehrlichman RS, Liang Y, Christian EP, Jonak GJ, Gur TL, Blendy JA, Dow HC, Brodtkin ES, Schneider F, Gur RC, Siegel SJ (2009) Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia. *Genes, brain, and behavior* 8:661-675.
- Halonen T, Nissinen J, Pitkanen A (2001) Chronic elevation of brain GABA levels beginning two days after status epilepticus does not prevent epileptogenesis in rats. *Neuropharmacology* 40:536-550.
- Hama Y, Katsuki H, Tochikawa Y, Suminaka C, Kume T, Akaike A (2006) Contribution of endogenous glycine site NMDA agonists to excitotoxic retinal damage in vivo. *Neuroscience research* 56:279-285.
- Hamase K, Konno R, Morikawa A, Zaitu K (2005) Sensitive determination of D-amino acids in mammals and the effect of D-amino-acid oxidase activity on their amounts. *Biol Pharm Bull* 28:1578-1584.
- Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13311-13316.
- Harai T, Inoue R, Fujita Y, Tanaka A, Horio M, Hashimoto K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H (2012) Decreased susceptibility to seizures induced by pentylentetrazole in serine racemase knockout mice. *Epilepsy Res*.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-89.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682-696.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-414.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hashimoto A (2002) Effect of the intracerebroventricular and systemic administration of L-serine on the concentrations of D- and L-serine in several brain areas and periphery of rat. *Brain Res* 955:214-220.
- Hashimoto A, Chiba S (2004) Effect of systemic administration of D-serine on the levels of D- and L-serine in several brain areas and periphery of rat. *Eur J Pharmacol* 495:153-158.
- Hashimoto A, Kanda J, Oka T (2000) Effects of N-methyl-D-aspartate, kainate or veratridine on extracellular concentrations of free D-serine and L-glutamate in rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Brain Res Bull* 53:347-351.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K (1992a) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS letters* 296:33-36.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Konno R, Niwa A, Yasumura Y, Oka T, Takahashi K (1993a) Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Neurosci Lett* 152:33-36.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K (1993b) Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem* 60:783-786.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T (1992b) 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-phthalaldehyde. *J Chromatogr* 582:41-48.
- Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T (1995a) Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience* 66:635-643.
- Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T (1995b) Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience* 66:635-643.

- Hashimoto K, Fujita Y, Horio M, Kunitachi S, Iyo M, Ferraris D, Tsukamoto T (2009) Co-administration of a D-amino acid oxidase inhibitor potentiates the efficacy of D-serine in attenuating prepulse inhibition deficits after administration of dizocilpine. *Biol Psychiatry* 65:1103-1106.
- Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Hasegawa H, Imai K, Iyo M (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* 60:572-576.
- Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Okada S, Komatsu N, Okamura N, Koike K, Koizumi H, Kumakiri C, Imai K, Iyo M (2004) Possible role of D-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 28:385-388.
- Hashimoto K, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Takei N, Iyo M (2005) No changes in serum epidermal growth factor levels in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 135:257-260.
- Hatanaka T, Huang W, Nakanishi T, Bridges CC, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy ME, Ganapathy V (2002) Transport of D-serine via the amino acid transporter ATB(0,+) expressed in the colon. *Biochem Biophys Res Commun* 291:291-295.
- Hawkins BT, Egleton RD (2006) Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. *J Neurosci Methods* 151:262-267.
- Haxaire C, Turpin FR, Potier B, Kervern M, Sinet PM, Barbanel G, Mothet JP, Dutar P, Billard JM (2012) Reversal of age-related oxidative stress prevents hippocampal synaptic plasticity deficits by protecting D-serine-dependent NMDA receptor activation. *Aging cell* 11:336-344.
- Hayashi F, Takahashi K, Nishikawa T (1997) Uptake of D- and L-serine in C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 239:85-88.
- Helboe L, Egebjerg J, Moller M, Thomsen C (2003) Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. *Eur J Neurosci* 18:2227-2238.
- Hemar A, Mulle C (2011) [Alzheimer's disease, amyloid peptide and synaptic dysfunction]. *Medecine sciences : M/S* 27:733-736.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
- Hepner F, Pollak A, Ulfing N, Yae-Kyung M, Lubec G (2005) Mass spectrometrical analysis of human serine racemase in foetal brain. *J Neural Transm* 112:805-811.
- 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.
- Heresco-Levy U, Vass A, Bloch B, Wolosker H, Dumin E, Balan L, Deutsch L, Kremer I (2009) Pilot controlled trial of D-serine for the treatment of post-traumatic stress disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:1275-1282.
- Hikida T, Mustafa AK, Maeda K, Fujii K, Barrow RK, Saleh M, Haganir RL, Snyder SH, Hashimoto K, Sawa A (2008) Modulation of D-serine levels in brains of mice lacking PICK1. *Biol Psychiatry* 63:997-1000.
- Hoffman HE, Jiraskova J, Ingr M, Zvelebil M, Konvalinka J (2009) Recombinant human serine racemase: enzymologic characterization and comparison with its mouse ortholog. *Protein expression and purification* 63:62-67.
- Horiike K, Tojo H, Arai R, Yamano T, Nozaki M, Maeda T (1987) Localization of D-amino acid oxidase in Bergmann glial cells and astrocytes of rat cerebellum. *Brain Res Bull* 19:587-596.
- Horio M, Kohno M, Fujita Y, Ishima T, Inoue R, Mori H, Hashimoto K (2011) Levels of D-serine in the brain and peripheral organs of serine racemase (Srr) knock-out mice. *Neurochem Int* 59:853-859.
- Huang LK, Wang M-JJ (1995) Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness. *pattern recognition* 28:41-51.
- Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12885-12890.

- Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1:383-386.
- 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.
- Ishiwata S, Ogata S, Umino A, Shiraku H, Ohashi Y, Kajii Y, Nishikawa T (2013) Increasing effects of S-methyl-L-cysteine on the extracellular D-serine concentrations in the rat medial frontal cortex. *Amino acids*.
- Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y, Medina I (2006) Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 572:789-798.
- Jansen KL, Faull RL, Dragunow M, Synek BL (1990) Alzheimer's disease: changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors--an autoradiographic study. *Neuroscience* 39:613-627.
- Javitt DC, Zukin SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 148:1301-1308.
- Johnson KA, Conn PJ, Niswender CM (2009) Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* 8:475-491.
- Junjaud G, Rouaud E, Turpin F, Mothet JP, Billard JM (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.
- Takegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaito K, Yuzaki M (2011) D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the delta2 glutamate receptor. *Nat Neurosci* 14:603-611.
- Kantrowitz JT, Malhotra AK, Cornblatt B, Silipo G, Balla A, Suckow RF, D'Souza C, Saksida J, Woods SW, Javitt DC (2010) High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res* 121:125-130.
- Kartvelishvili 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.
- Kasai Y, Tachikawa M, Hirose S, Akanuma S, Hosoya K (2011) Transport systems of serine at the brain barriers and in brain parenchymal cells. *J Neurochem* 118:304-313.
- Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y, et al. (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 81:245-252.
- Katsuki H, Nonaka M, Shirakawa H, Kume T, Akaike A (2004) Endogenous D-serine is involved in induction of neuronal death by N-methyl-D-aspartate and simulated ischemia in rat cerebrocortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* 311:836-844.
- Katsuki H, Watanabe Y, Fujimoto S, Kume T, Akaike A (2007) Contribution of endogenous glycine and d-serine to excitotoxic and ischemic cell death in rat cerebrocortical slice cultures. *Life Sci* 81:740-749.
- Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E (1997) Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 272:18518-18521.
- Khan AC, Michael AC (2003) Invasive consequences of using micro-electrodes and microdialysis probes in the brain. *Trends in Analytical Chemistry* 22:6.
- Kim PM, Aizawa H, Kim PS, Huang AS, Wickramasinghe SR, Kashani AH, Barrow RK, Hagan RL, Ghosh A, Snyder SH (2005) Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2105-2110.
- Kirschner DL, Green TK (2009) Separation and sensitive detection of D-amino acids in biological matrices. *J Sep Sci* 32:2305-2318.

- Kirschner DL, Wilson AL, Drew KL, Green TK (2009a) Simultaneous efflux of endogenous D-ser and L-glu from single acute hippocampus slices during oxygen glucose deprivation. *J Neurosci Res*.
- Kirschner DL, Wilson AL, Drew KL, Green TK (2009b) Simultaneous efflux of endogenous D-ser and L-glu from single acute hippocampus slices during oxygen glucose deprivation. *J Neurosci Res* 87:2812-2820.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.
- Kumashiro S, Hashimoto A, Nishikawa T (1995) Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases. *Brain Res* 681:117-125.
- Kvajo M, Dhillia A, Swor DE, Karayiorgou M, Gogos JA (2008) Evidence implicating the candidate schizophrenia/bipolar disorder susceptibility gene G72 in mitochondrial function. *Mol Psychiatry* 13:685-696.
- 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. *Human molecular genetics* 18:3227-3243.
- Labrie V, Lipina T, Roder JC (2008) Mice with reduced NMDA receptor glycine affinity model some of the negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology* 200:217-230.
- 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, and behavior* 9:11-25.
- Labrie V, Wong AH, Roder JC (2011) Contributions of the d-serine pathway to schizophrenia. *Neuropharmacology*.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Lai MC, Lui CC, Yang SN, Wang JY, Huang LT (2009) Epileptogenesis is increased in rats with neonatal isolation and early-life seizure and ameliorated by MK-801: a long-term MRI and histological study. *Pediatr Res* 66:441-447.
- Lane HY, Chang YC, Liu YC, Chiu CC, Tsai GE (2005) Sarcosine or D-serine add-on treatment for acute exacerbation of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 62:1196-1204.
- Lane HY, Lin CH, Huang YJ, Liao CH, Chang YC, Tsai GE (2010) A randomized, double-blind, placebo-controlled comparison study of sarcosine (N-methylglycine) and D-serine add-on treatment for schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:451-460.
- Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460:525-542.
- Lau D, Bading H (2009) Synaptic activity-mediated suppression of p53 and induction of nuclear calcium-regulated neuroprotective genes promote survival through inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Neurosci* 29:4420-4429.
- Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 14:511-517.
- Leveille F, El Gaamouch F, Goux E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22:4258-4271.
- Leveille F, Papadia S, Fricker M, Bell KF, Soriano FX, Martel MA, Puddifoot C, Habel M, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Tolkovsky AM, Hardingham GE (2010) Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci* 30:2623-2635.
- Liang LP, Beaudoin ME, Fritz MJ, Fulton R, Patel M (2007) Kainate-induced seizures, oxidative stress and neuronal loss in aging rats. *Neuroscience* 147:1114-1118.
- Lipton SA (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5:160-170.

- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304:1021-1024.
- Liu YH, Wang L, Wei LC, Huang YG, Chen LW (2009) Up-regulation of D-serine might induce GABAergic neuronal degeneration in the cerebral cortex and hippocampus in the mouse pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res* 34:1209-1218.
- Liu Z, Stafstrom CE, Sarkisian MR, Yang Y, Hori A, Tandon P, Holmes GL (1997) Seizure-induced glutamate release in mature and immature animals: an in vivo microdialysis study. *Neuroreport* 8:2019-2023.
- Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kohr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS letters* 315:318-322.
- Loo DT (2011) In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol* 682:3-13.
- Loss CM, Cordova SD, de Oliveira DL (2012) Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 1474:110-117.
- Lu M, Fan Y, Tang M, Qian X, Ding J, Hu G (2011) Potentiation of D-serine involves degeneration of dopaminergic neurons in MPTP/p mouse model of Parkinson's disease. *CNS neuroscience & therapeutics* 17:796-798.
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA archives of ophthalmology* 58:193-201.
- Madeira C, Freitas ME, Vargas-Lopes C, Wolosker H, Panizzutti R (2008) Increased brain D-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia. *Schizophr Res* 101:76-83.
- Maekawa M, Watanabe M, Yamaguchi S, Konno R, Hori Y (2005) Spatial learning and long-term potentiation of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *Neuroscience research* 53:34-38.
- Mandarim-de-Lacerda CA (2003) Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 75:469-486.
- Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, Shoshan MC (2002) Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* 22:3003-3013.
- Marksteiner J, Prommegger R, Sperk G (1990) Effect of anticonvulsant treatment on kainic acid-induced increases in peptide levels. *Eur J Pharmacol* 181:241-246.
- Martina M, Gorfinkel Y, Halman S, Lowe JA, Periyalwar P, Schmidt CJ, Bergeron R (2004) Glycine transporter type 1 blockade changes NMDA receptor-mediated responses and LTP in hippocampal CA1 pyramidal cells by altering extracellular glycine levels. *J Physiol* 557:489-500.
- 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, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, Gasnier B, Klingauf J, Sweedler JV, Jahn R, Mothet JP (2013) Storage and Uptake of D-Serine into Astrocytic Synaptic-Like Vesicles Specify Gliotransmission. *J Neurosci* 33:3413-3423.
- Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP (2002) Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Progress in brain research* 135:237-251.
- Matsuda S, Matsuzawa D, Nakazawa K, Sutoh C, Ohtsuka H, Ishii D, Tomizawa H, Iyo M, Shimizu E (2010) d-serine enhances extinction of auditory cued fear conditioning via ERK1/2 phosphorylation in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 34:895-902.
- Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 65:454-458.

- Mattson MP (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine* 3:65-94.
- McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE (1997) Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci* 17:2284-2294.
- Meador-Woodruff JH, Clinton SM, Beneyto M, McCullumsmith RE (2003) Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003:75-93.
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr., Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374:647-650.
- Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG (1999) Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 36:189-204.
- Mello LE, Covolan L (1996) Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res* 26:123-129.
- Mikati MA, Holmes GL, Chronopoulos A, Hyde P, Thurber S, Gatt A, Liu Z, Werner S, Stafstrom CE (1994) Phenobarbital modifies seizure-related brain injury in the developing brain. *Annals of neurology* 36:425-433.
- Millan MJ (2005) N-Methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology* 179:30-53.
- Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD, Ko RW, Vasuta OC, Graham RK, Hayden MR, Murphy TH, Raymond LA (2010) Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron* 65:178-190.
- Mitchell J, Paul P, Chen HJ, Morris A, Payling M, Falchi M, Habgood J, Panoutsou S, Winkler S, Tisato V, Hajitou A, Smith B, Vance C, Shaw C, Mazarakis ND, de Belleruche J (2010) Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7556-7561.
- Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 510:641-654.
- Miyoshi Y, Koga R, Oyama T, Han H, Ueno K, Masuyama K, Itoh Y, Hamase K (2012) HPLC analysis of naturally occurring free D-amino acids in mammals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 69:42-49.
- Molina JA, Jimenez-Jimenez FJ, Aguilar MV, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, Gonzalez-Munoz MJ, de Bustos F, Porta J, Orti-Pareja M, Zurdo M, Barrios E, Martinez-Para MC (1998) Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105:479-488.
- Montminy MR, Bilezikjian LM (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328:175-178.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Morales-Garcia JA, Luna-Medina R, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A (2009) Anticonvulsant and neuroprotective effects of the novel calcium antagonist NP04634 on kainic acid-induced seizures in rats. *J Neurosci Res* 87:3687-3696.
- Moreno S, Nardacci R, Cimini A, Ceru MP (1999) Immunocytochemical localization of D-amino acid oxidase in rat brain. *Journal of neurocytology* 28:169-185.
- Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Otani K, Kishimoto M, Morio A, Kotaka T, Okahisa Y, Matsushita M, Morikawa A, Hamase K, Zaitzu K, Kuroda S (2007) A genetic variant of the serine racemase gene is associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 61:1200-1203.

- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000a) 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, Parent AT, Wolosker H, Brady ROJ, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000b) 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.
- Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, Dingledine R (1998) Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* 1:659-667.
- Mustafa AK, Ahmad AS, Zeynalov E, Gazi SK, Sikka G, Ehmsen JT, Barrow RK, Coyle JT, Snyder SH, Dore S (2010) Serine racemase deletion protects against cerebral ischemia and excitotoxicity. *J Neurosci* 30:1413-1416.
- Mustafa AK, Kim PM, Snyder SH (2004) D-Serine as a putative glial neurotransmitter. *Neuron Glia Biol* 1:275-281.
- Mustafa AK, Kumar M, Selvakumar B, Ho GP, Ehmsen JT, Barrow RK, Amzel LM, Snyder SH (2007) Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2950-2955.
- Mustafa AK, van Rossum DB, Patterson RL, Maag D, Ehmsen JT, Gazi SK, Chakraborty A, Barrow RK, Amzel LM, Snyder SH (2009) Glutamatergic regulation of serine racemase via reversal of PIP2 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2921-2926.
- Nagata Y, Borghi M, Fisher GH, D'Aniello A (1995) Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. *Brain Res Bull* 38:181-183.
- Nagata Y, Horiike K, Maeda T (1994) Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Res* 634:291-295.
- Nagata Y, Uehara T, Kitamura Y, Nomura Y, Horiike K (1998) D-serine content and D-[3H]serine binding in the brain regions of the senescence-accelerated mouse. *Mechanisms of ageing and development* 104:115-124.
- Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, Inatomi J, Shiokawa Y, Yamaguchi K, Saito I, Endou H, Kanai Y (2000) Cloning and characterization of a human brain Na(+)-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett* 287:231-235.
- Naur P, Hansen KB, Kristensen AS, Dravid SM, Pickering DS, Olsen L, Vestergaard B, Egebjerg J, Gajhede M, Traynelis SF, Kastrop JS (2007) Ionotropic glutamate-like receptor delta2 binds D-serine and glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14116-14121.
- Nicholson C, Sykova E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21:207-215.
- Nicoletti JN, Shah SK, McCloskey DP, Goodman JH, Elkady A, Atassi H, Hylton D, Rudge JS, Scharfman HE, Croll SD (2008) Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience* 151:232-241.
- Nunes EA, MacKenzie EM, Rossolatos D, Perez-Parada J, Baker GB, Dursun SM (2012) D-serine and schizophrenia: an update. *Expert review of neurotherapeutics* 12:801-812.
- O'Brien KB, Bowser MT (2006) Measuring D-serine efflux from mouse cortical brain slices using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 27:1949-1956.

- Ohnuma T, Sakai Y, Maeshima H, Hatano T, Hanzawa R, Abe S, Kida S, Shibata N, Suzuki T, Arai H (2008) Changes in plasma glycine, L-serine, and D-serine levels in patients with schizophrenia as their clinical symptoms improve: results from the Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 32:1905-1912.
- Okamoto S, Pouladi MA, Talantova M, Yao D, Xia P, Ehrnhoefer DE, Zaidi R, Clemente A, Kaul M, Graham RK, Zhang D, Vincent Chen HS, Tong G, Hayden MR, Lipton SA (2009) Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nature medicine* 15:1407-1413.
- Okiyama K, Smith DH, White WF, Richter K, McIntosh TK (1997) Effects of the novel NMDA antagonists CP-98,113, CP-101,581 and CP-101,606 on cognitive function and regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *Journal of neurotrauma* 14:211-222.
- Oldendorf WH (1971) Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *The American journal of physiology* 221:1629-1639.
- Oldenziel WH, Dijkstra G, Cremers TI, Westerink BH (2006) In vivo monitoring of extracellular glutamate in the brain with a microsensor. *Brain Res* 1118:34-42.
- Oliet SH, Mothet JP (2006) Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function. *Glia* 54:726-737.
- Oliet SH, Mothet JP (2009) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158:275-283.
- Olney JW (1969) Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 28:455-474.
- Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sanchez-Gonzalez DJ, Martinez-Martinez CM, Floriano-Sanchez E, Santamaria A, Ramirez V, Bobadilla NA, Pedraza-Chaverri J (2007) Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology* 229:123-135.
- Otte DM, Bilkei-Gorzo A, Filiou MD, Turck CW, Yilmaz O, Holst MI, Schilling K, Abou-Jamra R, Schumacher J, Benzel I, Kunz WS, Beck H, Zimmer A (2009) Behavioral changes in G72/G30 transgenic mice. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 19:339-348.
- 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.
- Panizzutti R, De Miranda J, Ribeiro CS, Engelender S, Wolosker H (2001) A new strategy to decrease N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coactivation: inhibition of D-serine synthesis by converting serine racemase into an eliminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5294-5299.
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Siffringer M, Fowler J, Stefovskva V, McKenzie G, Craigon M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11:476-487.
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Parent JM, von dem Bussche N, Lowenstein DH (2006) Prolonged seizures recruit caudal subventricular zone glial progenitors into the injured hippocampus. *Hippocampus* 16:321-328.
- Patel J, Zinkand WC, Thompson C, Keith R, Salama A (1990) Role of glycine in the N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cytotoxicity. *J Neurochem* 54:849-854.
- Paul P, de Belleruche J (2012) The role of D-amino acids in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a review. *Amino acids* 43:1823-1831.
- Pellegrini JW, Lipton SA (1993) Delayed administration of memantine prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *Annals of neurology* 33:403-407.

- Pernot P, Maucler C, Tholance Y, Vasylyeva N, Debilly G, Pollegioni L, Cespuglio R, Marinesco S (2012) d-Serine diffusion through the blood-brain barrier: effect on d-serine compartmentalization and storage. *Neurochem Int* 60:837-845.
- Pernot P, Mothet JP, Schuvailo O, Soldatkin A, Pollegioni L, Pilone M, Adeline MT, Cespuglio R, Marinesco S (2008) Characterization of a yeast D-amino acid oxidase microbiosensor for D-serine detection in the central nervous system. *Anal Chem* 80:1589-1597.
- Pikal M (1992) The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Deliv Rev* 46:281-305.
- Pilone MS (2000) D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci* 57:1732-1747.
- Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C (1999) N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2508-2513.
- Pollegioni L, Falbo A, Pilone MS (1992a) Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1120:11-16.
- Pollegioni L, Falbo A, Pilone MS (1992b) Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1120:11-16.
- Pollegioni L, Molla G, Campaner S, Martegani E, Pilone MS (1997) Cloning, sequencing and expression in *E. coli* of a D-amino acid oxidase cDNA from *Rhodotorula gracilis* active on cephalosporin C. *J Biotechnol* 58:115-123.
- Pollegioni L, Molla G, Sacchi S, Rosini E, Verga R, Pilone MS (2008) Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:1-16.
- Pollegioni L, Sacchi S (2010) Metabolism of the neuromodulator D-serine. *Cell Mol Life Sci* 67:2387-2404.
- Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280:6447-6454.
- Potier B, Turpin FR, Sinet PM, Rouaud E, Mothet JP, Videau C, Epelbaum J, Dutar P, Billard JM (2010) Contribution of the d-Serine-Dependent Pathway to the Cellular Mechanisms Underlying Cognitive Aging. *Frontiers in aging neuroscience* 2:1.
- Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ (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. *Molecular pharmacology* 48:841-848.
- Qin ZH, Wang Y, Chen RW, Wang X, Ren M, Chuang DM, Chase TN (2001) Prostaglandin A(1) protects striatal neurons against excitotoxic injury in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 297:78-87.
- Qin ZH, Wang Y, Nakai M, Chase TN (1998) Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Molecular pharmacology* 53:33-42.
- Rabacchi S, Bailly Y, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1992) Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science* 256:1823-1825.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991a) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics* 288:481-487.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991b) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244-4250.
- Randall RD, Thayer SA (1992) Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 12:1882-1895.
- Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Dempsey RJ (2001) Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 911:96-100.
- Rattka M, Brandt C, Loscher W (2012) The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: Epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. *Epilepsy Res.*

- Reynolds IJ, Hastings TG (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 15:3318-3327.
- Ribeiro CS, Reis M, Panizzutti R, de Miranda J, Wolosker H (2002) Glial transport of the neuromodulator D-serine. *Brain Res* 929:202-209.
- Rice M, Nicholson C (eds.) (1995) Diffusion and ion shifts in the brain extracellular microenvironment and their relevance for voltametric measurements. Totowa: Boulton A, Baker G, Adams R.
- Rosenberg D, Artoul S, Segal AC, Kolodney G, Radzishevsky I, Dikopoltsev E, Foltyn VN, Inoue R, Mori H, Billard JM, Wolosker H (2013) Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J Neurosci* 33:3533-3544.
- Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, Wolosker H (2010) Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *FASEB J*.
- Rosenzweig ES, Barnes CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in neurobiology* 69:143-179.
- Rossetti F, de Araujo Furtado M, Pak T, Bailey K, Shields M, Chanda S, Addis M, Robertson BD, Moffett M, Lumley LA, Yourick DL (2012) Combined diazepam and HDAC inhibitor treatment protects against seizures and neuronal damage caused by soman exposure. *Neurotoxicology* 33:500-511.
- Russell JM (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological reviews* 80:211-276.
- Rutter AR, Fradley RL, Garrett EM, Chapman KL, Lawrence JM, Rosahl TW, Patel S (2007) Evidence from gene knockout studies implicates Asc-1 as the primary transporter mediating d-serine reuptake in the mouse CNS. *Eur J Neurosci* 25:1757-1766.
- Ryu HJ, Kim JE, Yeo SI, Kim DS, Kwon OS, Choi SY, Kang TC (2010) Potential roles of D-serine and serine racemase in experimental temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res* 88:2469-2482.
- 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.
- Salinska E, Danysz W, Lazarewicz JW (2005) The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 43:322-339.
- Sanchez PE, Fares RP, Risso JJ, Bonnet C, Bouvard S, Le-Cavorsin M, Georges B, Moulin C, Belmeguenai A, Bodenec J, Morales A, Pequignot JM, Baulieu EE, Levine RA, Bezin L (2009) Optimal neuroprotection by erythropoietin requires elevated expression of its receptor in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9848-9853.
- Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S (2007) D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 26:4149-4159.
- Sasabe J, Miyoshi Y, Suzuki M, Mita M, Konno R, Matsuoka M, Hamase K, Aiso S (2012) D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:627-632.
- Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M (1998) Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 71:2349-2364.
- Schauwecker PE (2010) Neuroprotection by glutamate receptor antagonists against seizure-induced excitotoxic cell death in the aging brain. *Exp Neurol* 224:207-218.
- Schauwecker PE (2012) Strain differences in seizure-induced cell death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 45:297-304.
- 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.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-3952.

- Scolari MJ, Acosta GB (2007) D-serine: a new word in the glutamatergic neuro-glial language. *Amino acids* 33:563-574.
- Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA (2009) The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 81:345-365.
- Sezgin M, Sankur B (2004) Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic Imaging* 13:146-165.
- Shacka JJ, Lu J, Xie ZL, Uchiyama Y, Roth KA, Zhang J (2007) Kainic acid induces early and transient autophagic stress in mouse hippocampus. *Neurosci Lett* 414:57-60.
- Shafqat S, Tamarappoo BK, Kilberg MS, Puranam RS, McNamara JO, Guadano-Ferraz A, Fremeau RT, Jr. (1993) Cloning and expression of a novel Na(+)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na+/glutamate cotransporters. *J Biol Chem* 268:15351-15355.
- 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.
- Shatskikh T, Zhao Q, Zhou JL, Holmes GL (2009) Effect of topiramate on cognitive function and single units from hippocampal place cells following status epilepticus. *Epilepsy & behavior : E&B* 14:40-47.
- Shaw SH, Kelly M, Smith AB, Shields G, Hopkins PJ, Loftus J, Laval SH, Vita A, De Hert M, Cardon LR, Crow TJ, Sherrington R, DeLisi LE (1998) A genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *American journal of medical genetics* 81:364-376.
- 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.
- Shoji K, Mariotto S, Ciampa AR, Suzuki H (2006) Regulation of serine racemase activity by D-serine and nitric oxide in human glioblastoma cells. *Neurosci Lett* 392:75-78.
- Sieg A, Guy RH, Delgado-Charro MB (2004) Electroosmosis in transdermal iontophoresis: implications for noninvasive and calibration-free glucose monitoring. *Biophys J* 87:3344-3350.
- Sieg A, Jeanneret F, Fathi M, Hochstrasser D, Rudaz S, Veuthey JL, Guy RH, Delgado-Charro MB (2008) Extraction of amino acids by reverse iontophoresis: simulation of therapeutic monitoring in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 70:908-913.
- Singh L, Oles RJ, Tricklebank MD (1990) Modulation of seizure susceptibility in the mouse by the strychnine-insensitive glycine recognition site of the NMDA receptor/ion channel complex. *British journal of pharmacology* 99:285-288.
- Singh SP, Singh V (2011) Meta-analysis of the efficacy of adjunctive NMDA receptor modulators in chronic schizophrenia. *CNS drugs* 25:859-885.
- Sklar P (2002) Linkage analysis in psychiatric disorders: the emerging picture. *Annual review of genomics and human genetics* 3:371-413.
- Slais K, Vorisek I, Zoremba N, Homola A, Dmytrenko L, Sykova E (2008) Brain metabolism and diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Neurol* 209:145-154.
- Smith QR (2000) Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr* 130:1016S-1022S.
- Smith QR, Momma S, Aoyagi M, Rapoport SI (1987) Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 49:1651-1658.
- Smith SM, Uslaner JM, Yao L, Mullins CM, Surles NO, Huszar SL, McNaughton CH, Pascarella DM, Kandebo M, Hinchliffe RM, Sparey T, Brandon NJ, Jones B, Venkatraman S, Young MB, Sachs N, Jacobson MA, Hutson PH (2009) The behavioral and neurochemical effects of a novel D-amino acid oxidase inhibitor compound 8 [4H-thieno [3,2-b]pyrrole-5-carboxylic acid] and D-serine. *J Pharmacol Exp Ther* 328:921-930.
- Smolders I, Khan GM, Lindekens H, Prikken S, Marvin CA, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997) Effectiveness of vigabatrin against focally evoked pilocarpine-induced seizures and concomitant changes in extracellular hippocampal and cerebellar glutamate, gamma-

- aminobutyric acid and dopamine levels, a microdialysis-electrocorticography study in freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1239-1248.
- Soerensen J, Pekcec A, Fuest C, Nickel A, Potschka H (2009) Pyrrolidine dithiocarbamate protects the piriform cortex in the pilocarpine status epilepticus model. *Epilepsy Res* 87:177-183.
- Sperk G (1994) Kainic acid seizures in the rat. *Progress in neurobiology* 42:1-32.
- Starr MS (1995) Antiparkinsonian actions of glutamate antagonists--alone and with L-DOPA: a review of evidence and suggestions for possible mechanisms. *Journal of neural transmission Parkinson's disease and dementia section* 10:141-185.
- Steffek AE, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH (2006) Serine racemase protein expression in cortex and hippocampus in schizophrenia. *Neuroreport* 17:1181-1185.
- Suh YH, Checler F (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacological reviews* 54:469-525.
- Sun H, Wu HQ, Zhang GL, Zhan SQ, Zhang R, Wang HQ (2012) [Characteristic of microglial activation of hippocampus in experimental epileptic rats]. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Zhejiang University Medical sciences* 41:310-314.
- Takahashi K, Hayashi F, Nishikawa T (1997) In vivo evidence for the link between L- and D-serine metabolism in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 69:1286-1290.
- Takano J, Tomioka M, Tsubuki S, Higuchi M, Iwata N, Itohara S, Maki M, Saido TC (2005) Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *J Biol Chem* 280:16175-16184.
- Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1995) Light- and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in the mouse Purkinje cell. *Neurosci Lett* 188:89-92.
- Tanaka K, Graham SH, Simon RP (1996) The role of excitatory neurotransmitters in seizure-induced neuronal injury in rats. *Brain Res* 737:59-63.
- Tayarani I, Lefauconnier JM, Roux F, Bourre JM (1987) Evidence for an alanine, serine, and cysteine system of transport in isolated brain capillaries. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:585-591.
- Thompson M, Marecki JC, Marinesco S, Labrie V, Roder JC, Barger SW, Crow JP (2011) Paradoxical roles of serine racemase and D-serine in the G93A mSOD1 mouse model of ALS. *J Neurochem*.
- Thompson M, Marecki JC, Marinesco S, Labrie V, Roder JC, Barger SW, Crow JP (2012) Paradoxical roles of serine racemase and D-serine in the G93A mSOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 120:598-610.
- Thomsen C, Helboe L, Egebjerg J (2003) Use of ASC-1 inhibitors to treat neurological and psychiatric disorders. (Organisation, W. i. P., ed).
- Tominaga K, Nakanishi H, Yasuda Y, Yamamoto K (1998) Excitotoxin-induced neuronal death is associated with response of a unique intracellular aspartic proteinase, cathepsin E. *J Neurochem* 71:2574-2584.
- Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19:4180-4188.
- Tovar KR, Westbrook GL (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 34:255-264.
- Townsend M, Yoshii A, Mishina M, Constantine-Paton M (2003) Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1340-1345.
- 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.
- Tsai GE, Yang P, Chung LC, Tsai IC, Tsai CW, Coyle JT (1999) D-serine added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 156:1822-1825.

- Tsai PS, Kaufhold JP, Blinder P, Friedman B, Drew PJ, Karten HJ, Lyden PD, Kleinfeld D (2009) Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *J Neurosci* 29:14553-14570.
- Tsai W-H (1985) Moment-Preserving Thresholding: A New Approach. *computer vision graphics, and image processing* 29.
- Tuominen HJ, Tiihonen J, Wahlbeck K (2005) Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res* 72:225-234.
- Turk B, Turk V (2009) Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *J Biol Chem* 284:21783-21787.
- Turpin FR, Potier B, Dulong JR, Sinet PM, Alliot J, Oliet SH, Dutar P, Epelbaum J, Mothet JP, Billard JM (2011) Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiology of aging* 32:1495-1504.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L (1984) Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res* 321:237-253.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural brain research* 9:315-335.
- Tyler AL, Mahoney JM, Richard GR, Holmes GL, Lenck-Santini PP, Scott RC (2012) Functional network changes in hippocampal CA1 after status epilepticus predict spatial memory deficits in rats. *J Neurosci* 32:11365-11376.
- Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA (2006) S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441:513-517.
- Ulfing N, Neudorfer F, Bohl J (2000) Transient structures of the human fetal brain: subplate, thalamic reticular complex, ganglionic eminence. *Histology and histopathology* 15:771-790.
- Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004) Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res* 1015:169-174.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271:14883-14890.
- Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L (2005) Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuro-degenerative diseases* 2:147-159.
- Vargas-Lopes C, Madeira C, Kahn SA, Albino do Couto I, Bado P, Houzel JC, De Miranda J, de Freitas MS, Ferreira ST, Panizzutti R (2011) Protein kinase C activity regulates D-serine availability in the brain. *J Neurochem* 116:281-290.
- Vasylieva N, Barnych B, Meiller A, Maucler C, Pollegioni L, Lin JS, Barbier D, Marinesco S (2011) Covalent enzyme immobilization by poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE) for microelectrode biosensor preparation. *Biosens Bioelectron* 26:3993-4000.
- 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.
- Viggiano A, Marinesco S, Pain F, Meiller A, Gurden H (2012) Reconstruction of field excitatory post-synaptic potentials in the dentate gyrus from amperometric biosensor signals. *J Neurosci Methods* 206:1-6.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Vousden KH (2000) p53: death star. *Cell* 103:691-694.
- Wake K, Yamazaki H, Hanzawa S, Konno R, Sakio H, Niwa A, Hori Y (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* 297:25-28.

- Wang LZ, Zhu XZ (2003) Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development. *Acta pharmacologica Sinica* 24:965-974.
- Wang Y, Han R, Liang ZQ, Wu JC, Zhang XD, Gu ZL, Qin ZH (2008) An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy* 4:214-226.
- Wang Y, Qin ZH (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*.
- Weiser M, Heresco-Levy U, Davidson M, Javitt DC, Werbeloff N, Gershon AA, Abramovich Y, Amital D, Doron A, Konas S, Levkovitz Y, Liba D, Teitelbaum A, Mashiach M, Zimmerman Y (2012) A multicenter, add-on randomized controlled trial of low-dose d-serine for negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *The Journal of clinical psychiatry* 73:e728-734.
- West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 22:51-61.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical record* 231:482-497.
- Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* 44:851-859.
- Williams K (2001) Ifenprodil, a novel NMDA receptor antagonist: site and mechanism of action. *Curr Drug Targets* 2:285-298.
- 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.
- Wilson CL, Maidment NT, Shomer MH, Behnke EJ, Ackerson L, Fried I, Engel J, Jr. (1996) Comparison of seizure related amino acid release in human epileptic hippocampus versus a chronic, kainate rat model of hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 26:245-254.
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blumcke I (1996) NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 44:1167-1171.
- Wolosker H (2011) Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. *Biochim Biophys Acta*.
- Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH (1999a) 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.
- Wolosker H, Mori H (2012) Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. *Amino acids*.
- Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO, Jr., Ferris CD, Snyder SH (1999b) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:721-725.
- Wroge CM, Hogins J, Eisenman L, Mennerick S (2012) Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. *J Neurosci* 32:6732-6742.
- Wu S, Basile AS, Barger SW (2007) Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by secreted amyloid precursor protein (sAPP). *Current Alzheimer research* 4:243-251.
- Wu SZ, Bodles AM, Porter MM, Griffin WS, Basile AS, Barger SW (2004) Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *Journal of neuroinflammation* 1:2.
- Xia P, Chen HS, Zhang D, Lipton SA (2010) Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *J Neurosci* 30:11246-11250.
- Xu J, Kurup P, Zhang Y, Goebel-Goody SM, Wu PH, Hawasli AH, Baum ML, Bibb JA, Lombroso PJ (2009) Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci* 29:9330-9343.

- Yang FY, Lee YS, Cherng CG, Cheng LY, Chang WT, Chuang JY, Kao GS, Yu L (2010a) D-cycloserine, sarcosine and D-serine diminish the expression of cocaine-induced conditioned place preference. *J Psychopharmacol*.
- Yang JH, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita MO, Tomonaga S, Azuma N, Watanabe M, Hamase K, Zaitzu K, Machida T, Messing A, Itohara S, Hirabayashi Y, Furuya S (2010b) Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *J Biol Chem* 285:41380-41390.
- Yang S, Qiao H, Wen L, Zhou W, 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, 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.
- Yen J-C, Chuang F-J, Chuang S (1995) A New Criterion for Automatic Multilevel Thresholding. *IEEE TRANSACTIONS ON IMAGE PROCESSING* 4:370-378.
- Yoshikawa M, Nakajima K, Takayasu N, Noda S, Sato Y, Kawaguchi M, Oka T, Kobayashi H, Hashimoto A (2006) Expression of the mRNA and protein of serine racemase in primary cultures of rat neurons. *Eur J Pharmacol* 548:74-76.
- Yoshikawa M, Takayasu N, Hashimoto A, Sato Y, Tamaki R, Tsukamoto H, Kobayashi H, Noda S (2007) The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons. *Archives of histology and cytology* 70:127-134.
- Yoshimura T, Goto M (2008) D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *FEBS J* 275:3527-3537.
- Zhang H, Lin SC, Nicoletis MA (2009) Acquiring local field potential information from amperometric neurochemical recordings. *J Neurosci Methods* 179:191-200.
- Zhang X, Li CG, Ye CH, Liu ML (2001) Determination of molecular self-diffusion coefficient using multiple spin-echo NMR spectroscopy with removal of convection and background gradient artifacts. *Anal Chem* 73:3528-3534.
- 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.
- Zhuo M (2009) Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Molecular brain* 2:4.