



HAL
open science

Etude du métabolisme des pyramides du néocortex dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer - voies de signalisations impliquées dans la modulation de l'excitabilité des pyramides du néocortex par la noradrénaline

Juliette Piquet

► To cite this version:

Juliette Piquet. Etude du métabolisme des pyramides du néocortex dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer - voies de signalisations impliquées dans la modulation de l'excitabilité des pyramides du néocortex par la noradrénaline. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066180 . tel-02176022

HAL Id: tel-02176022

<https://theses.hal.science/tel-02176022>

Submitted on 7 Jul 2019

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Neurosciences

Ecole doctorale : Cerveau - Cognition - Comportement

**ETUDE DU METABOLISME DES PYRAMIDES DU
NEOCORTEX DANS UN MODELE MURIN DE LA MALADIE
D'ALZHEIMER**

-

**VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUEES DANS LA
MODULATION DE L'EXCITABILITE DES PYRAMIDES DU
NEOCORTEX PAR LA NORADRENALINE**

Présentée par

Juliette PIQUET

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Soutenue publiquement le 05 juillet 2017 devant un jury composé de :

M. AUDINAT Etienne	Directeur de Recherche	Rapporteur
M. GURDEN Hirac	Directeur de Recherche	Rapporteur
Mme. POTIER Marie-Claude	Directrice de Recherche	Examineur
M. CAULI Bruno	Directeur de Recherche	Directeur de thèse

A mes proches

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Etienne Audinat et Hirc Gurden d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail ainsi que Marie-Claude Potier qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à Hervé Chneiweiss qui m'a donné la possibilité de poursuivre mes travaux au sein du laboratoire Neurosciences Paris Seine et qui est intervenu en ma faveur auprès de l'UPMC afin que je puisse terminer sereinement mes travaux ainsi qu'à Alain Trembleau, directeur de l'ED3C, pour l'aide précieuse qu'il a pu apporter au cours de mon doctorat.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mon directeur de thèse, Bruno Cauli, qui a dirigé et supervisé méticuleusement mon travail depuis mon stage de M2. Je lui suis particulièrement reconnaissante de sa disponibilité, de son implication sincère tant sur le plan scientifique qu'humain et de son souci de rigueur.

Grâce à lui, j'ai eu l'opportunité de réaliser des collaborations fructueuses. A ce titre, je remercie Marie-Claude Potier, Gilles Bonvento et Thomas Kilduff de m'avoir permis de collaborer avec leurs équipes respectives ainsi que Juliette Ledouce et Rhîannan Williams pour leur implication dans le travail et nos échanges enrichissants, et enfin Luce Dauphinot qui m'a patiemment aiguillée sur les voies de la microdissection laser et de la PCR quantitative et avec qui ce fut un plaisir d'interagir.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe RCCN qui ont accompagné mon quotidien pendant ces 4 années. Merci entre autres à Bertrand Lambolez pour son esprit scientifique aiguisé, à Régine Hepp qui m'a confié son projet sur la noradrénaline et à Ludovic Tricoire pour les discussions en tout genre et le partage du bureau qui furent fort agréables. Merci également à Alexandre Lacroix pour ses nombreux conseils techniques, à Xavier Toussay pour son aide pendant mon M2 et à Antoine Bergel pour sa répartie et son humour. Je suis tout particulièrement reconnaissante envers Najete Benamer pour sa franchise, sa gentillesse et son rire sonore et envers Sandrine Picaud pour la douceur et la prévenance dont elle fait

preuve. Enfin, merci à la relève : Gabrielle Devienne, Benjamin Le gac, Jean-Yves Rivière et Clémentine Hatton pour leur présence et leur bonne humeur.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des équipes du 5ème étage, en particulier à Nathalie Leresche pour sa bienveillance. Merci également à Tom, Arturo, Malou, Damien et Nicolas pour leur gentillesse. Vous croiser, même brièvement, a toujours été un plaisir. Impossible d'oublier l'équipe de Philippe Faure : Stéfania, Jérémie, Samir, Steve, Romain, Fabio... merci pour la bonne ambiance que vous apportez à l'étage et pour les débats en tout genre qui fusent à l'heure du déjeuner. Merci à Sylvie Faivre qui réalise un travail impressionnant pour l'ensemble des équipes et qu'il sera difficile de remplacer. Une pensée également pour Emmanuel Demaury dont le dynamisme et la sympathie sont remarquables. Merci à Bernadette pour son énergie et son franc-parler qui fleurissent les murs du couloir.

Enfin je tiens à remercier ma famille, mes amis et tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin pendant ma rédaction.

Merci à Sophie Fayad pour son soutien chaleureux et ses formidables découvertes culinaires. Merci à Michael, mon binôme indéfectible durant ces 4 dernières années.

Merci à Mérédith pour la pause salvatrice du mercredi soir ainsi qu'à Cathy Laymet et Wayne Byars pour leur amour de la danse et l'étonnante facilité avec laquelle ils transmettent les secrets de cet art subtil.

Merci à mes proches qui m'ont apporté beaucoup d'amour et ont donné de leur temps pour finaliser ce manuscrit ; en particulier à ma mère pour ses relectures attentives et ses observations judicieuses et à Sébastien pour la longue et douloureuse biblio.

Un énorme merci à Lise et Maninon qui m'ont soutenue très fort et ont veillé à ce que je ne manque de rien ces derniers mois. Merci à Adeline, Sophie et Agnès pour toutes nos discussions intenses et enrichissantes, parce que les combats à mener sont nombreux. Merci à Marko, Joffrey, Aylwin, Titan et ma Sousou pour leur présence réconfortante.

Merci à ma mère et à mon père pour la grande liberté créative dont j'ai pu jouir pendant mon enfance, à ma grand-mère Juliette pour sa vivacité d'esprit et sa prodigieuse inventivité, à ma cousine et à mon grand-père qui m'ont aidée à me construire.

Préambule

Durant ma thèse, mes travaux de recherche ont porté sur deux sujets distincts : les troubles métaboliques dans la maladie d'Alzheimer d'une part et la modulation de l'excitabilité neuronale par la noradrénaline d'autre part. Ces travaux seront présentés dans des parties différentes.

Dans ces deux projets, je me suis intéressée aux cellules pyramidales néocorticales supragranulaires dans le modèle de la tranche *ex vivo*. Un chapitre préliminaire introduira le néocortex et son organisation structurelle.

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	2
PREAMBULE.....	6
SOMMAIRE	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	14
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	16
LISTE DES PUBLICATIONS	19
RESUME.....	20
PARTIE 1 :	22
LE NEOCORTEX COMME STRUCTURE D'INTERET	22
I. ANATOMIE EXTERNE DU NEOCORTEX.....	24
A. Aires corticales et fonctions cognitives associées	25
B. Processus cognitifs régionalisés	25
II. STRUCTURE INTERNE DU NEOCORTEX.....	27
A. Organisation en couches horizontales	27
B. Organisation en colonnes fonctionnelles verticales.....	29
III. DIVERSITE CELLULAIRE DU NEOCORTEX.....	30
A. Les cellules gliales.....	30
1. La microglie.....	31
2. Les oligodendrocytes	32
3. Les astrocytes	33
B. Les neurones	35
1. Les interneurones	36
3. Les cellules pyramidales.....	40

a. Caractérisation morphologique.....	40
b. Caractérisation électrophysiologique	42

PARTIE 2 :47

ETUDE DU METABOLISME DES NEURONES PYRAMIDAUX CORTICAUX DANS UN MODELE MURIN DE LA PATHOLOGIE ALZHEIMER47

INTRODUCTION.....49

I. LE METABOLISME DU GLUCOSE EST ESSENTIEL AUX FONCTIONS NEURONALES51

A. Le glucose sanguin fournit l'énergie nécessaire au maintien des activités neuronales et à l'intégrité du tissu nerveux51

1. Le glucose est la principale source d'énergie pour le cerveau	51
2. En quoi l'activité cérébrale est-elle énergivore ?.....	52
a. Rétablir les gradients ioniques.....	54
b. Synthétiser et recycler les neurotransmetteurs	56
c. Maintenir l'intégrité du tissu cérébral	58
3. Le passage du glucose sanguin vers les cellules se fait grâce à des transporteurs spécifiques	58
a. Familles de transporteurs du glucose.....	59
b. Isoformes cérébrales des transporteurs du glucose.....	59

B. Le métabolisme du glucose fait intervenir différents compartiments cellulaires.....65

1. Oxydations partielles cytosoliques	65
a. Rétention du glucose dans la cellule.....	65
b. Glycolyse.....	66
c. Voie des pentoses phosphates.....	69
d. Glycolyse "aérobie"	72
2. Transformation du pyruvate dans la mitochondrie.....	73
a. Formation d'acétyl-CoA	73
b. Cycle de Krebs	73
3. Oxydation complète au sein de la chaîne respiratoire	74
a. Oxydation des coenzymes réduites et formation d'un gradient de protons	75
b. Synthèse d'ATP dans la matrice mitochondriale	75

C. Le métabolisme du glucose nécessite des interactions étroites entre astrocytes et neurones77

1. Les astrocytes libèrent du lactate, substrat énergétique pour les neurones.....	78
2. Les astrocytes assurent la recapture du glutamate issu de l'activité synaptique	82
3. Contrairement aux neurones, les astrocytes possèdent des réserves de glycogène	83
4. La protection contre le stress oxydant nécessite une collaboration entre les deux types cellulaires .84	84
a. La respiration neuronale produit des dérivés actifs de l'azote et de l'oxygène.....	84
b. Les réserves antioxydantes des neurones sont limitées	85
c. Le métabolisme du glucose protège du stress oxydant via la voie des pentoses phosphates	88

II. LE METABOLISME DU GLUCOSE EST ALTERE DANS LA PATHOLOGIE ALZHEIMER90

A. Caractéristiques anatomopathologiques de la maladie d'Alzheimer	90
1. Périodes cliniques et évolution de la pathologie	90
2. Accumulations protéiques constituant les lésions spécifiques de la MA	91
3. Recherche de la pathogenèse de la MA	92
B. Etude de la MA grâce aux techniques d'imagerie cérébrale.....	96
1. Outils d'imagerie cérébrale utilisés dans le contexte de la MA.....	96
a. Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle.....	96
b. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire	96
c. Imagerie du tenseur de diffusion	97
d. TEP.....	98
2. Biomarqueurs utilisés pour l'étude de la MA par imagerie fonctionnelle	100
a. Dépôts amyloïdes et protéines Tau hyperphosphorylées	100
b. Réduction du volume cérébral.....	103
c. Altération de la connectivité structurelle et anatomique.....	105
d. Métabolites cérébraux et RMN	106
3. Hypométabolisme du glucose, biomarqueur précoce de la MA.....	107
a. FDG et réductions locales du métabolisme cérébral chez les patients de la MA.....	107
c. FDG et réductions locales du métabolisme cérébral dans les cas de MCI.....	109
 PROBLEMATIQUE	 113
 MATERIELS ET METHODES	 117
A. Les souris 3xTg comme modèle d'étude de la MA	119
B. Etude du métabolisme au moyen de sondes FRET.....	120
1. Expression en tranches des biosenseurs FRET codés génétiquement	120
2. Imagerie dynamique du métabolisme	120
3. Inhibiteurs pharmacologiques des voies métaboliques.....	121
 RESULTATS : ARTICLE.....	 123
 DISCUSSION.....	 159
A. Le métabolisme du glucose est progressivement altéré dans la MA	161
1. Transport du glucose.....	161
2. Activité glycolytique	162
3. Phosphorylation oxydante.....	163
4. Stress glycatif	164
5. Stress oxydant	165
6. Voie des PPP.....	166
B. Il existe des interactions entre altérations métaboliques, peptides Aβ et protéines Tau	167
1. Déficits métaboliques et Aβ.....	167
2. Déficits métaboliques et hyperphosphorylation de la protéine Tau	169
C. Les déficits métaboliques affectent les fonctions neuronales	170
1. Métabolisme et dysfonctions synaptiques	170
2. Pourquoi certaines régions cérébrales sont-elles plus sévèrement affectées que d'autres ?	172

CONCLUSION.....	173
------------------------	------------

PARTIE 3 :	177
-------------------------	------------

CONTRIBUTION DES RECEPTEURS A1 ET B NORADRENERGIQUES DANS LA MODULATION DE L'EXCITABILITE DES CELLULES PYRAMIDALES CORTICALES CHEZ LA SOURIS	177
---	------------

INTRODUCTION.....	179
--------------------------	------------

I. PHYSIOLOGIE DE LA NORADRENALINE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	182
---	------------

A. La NA est impliquée dans de nombreuses fonctions cérébrales	182
1. Régulation du flux sanguin cérébral	182
2. Réponse au stress	182
3. Eveil, attention et concentration	183
4. Acuité sensorielle	183
5. Formation de la mémoire, sa consolidation et sa rétention	184
B. La production de la NA est assurée par des groupes de neurones formant des noyaux	184
1. Les noyaux noradrénergiques sont localisés au niveau du tronc cérébral.....	184
2. Le Locus Coeruleus est le principal noyau noradrénergique	186
3. Les fibres noradrénergiques innervent l'ensemble du néocortex	188
C. Le métabolisme de la NA est compartimenté.....	189
1. Voie de synthèse et stockage de la NA.....	190
2. Libération de la NA par exocytose	190
3. Recapture de la NA extracellulaire	192
4. Recyclage de la NA par les neurones noradrénergiques	193
5. Catabolisme	194

II. EFFET DE LA NA SUR LES NEURONES PYRAMIDAUX CORTICAUX	196
---	------------

A. Les récepteurs noradrénergiques sont largement exprimés dans le néocortex.....	197
1. Distribution corticale des récepteurs α adrénergiques	197
a. Localisation des récepteurs α_1	197
b. Localisation des récepteurs α_2	199
2. Distribution corticale des récepteurs β adrénergiques	200
B. Les récepteurs noradrénergiques sont couplés à des protéines G assurant la transduction du signal	201
1. Les récepteurs α adrénergiques	201
a. Récepteurs α_1 adrénergiques et protéine Gq	201
b. Récepteurs α_2 adrénergiques et protéine Gi	203
2. Les récepteurs β adrénergiques sont couplés aux protéines Gs.....	204
3. L'oligomérisation des récepteurs module la signalisation intracellulaire	205
D. La NA agit sur les propriétés électrophysiologiques des neurones pyramidaux du néocortex.....	207

1. Effets à long terme sur la plasticité synaptique.....	207
2. Effets synaptiques de la NA	209
a. Régulation des courants glutamatergiques	209
b. Régulation de la signalisation GABAergique.....	211
3. Modulation des propriétés intrinsèques des cellules.....	211
a. Modulation des canaux calciques	212
b. Modulation des canaux potassiques	212
PROBLEMATIQUE	219
MATERIEL ET METHODES.....	223
A. Préparation des tranches de cortex	225
B. Enregistrement par patch-clamp des cellules pyramidales corticales	225
C. Statistiques.....	228
D. Pharmacologie.....	228
E. Révélation du marquage à la biocytine et immunofluorescence	229
RESULTATS	231
I. L'effet de la NA sur la sAHP ne passe pas uniquement par l'activation des récepteurs β adrénergiques	233
A. Inhibition de la sAHP par la NA (10 μ M)	234
B. Effet significatif des agonistes des RA- α 1 et β adrénergiques sur la sAHP.....	235
II. Les agonistes α1 et β adrénergiques ont un effet complémentaire sur IsAHP.....	237
A. Inhibition de IsAHP par des concentrations croissantes de NA	239
B. Effet noradrénergique indépendant du réseau neuronal alentour	240
C. Effet complémentaire des agonistes α 1 et β adrénergiques sur IsAHP	242
DISCUSSION.....	245
A. Implication des récepteurs β et α1 dans la modulation de la sAHP des pyramides des couches II et III du néocortex	247
B. Effet additif des RA-β et α1	248
C. Hétérogénéité de la sAHP	248
1. Génération d'une sADP.....	249
2. Rôle des RA- α 1 sur IsAHP ou IsADP ?	249
3. Répartition des deux sous-types de récepteurs.....	250
4. Quelles conductances seraient responsables de la sADP ?	251
Conclusion	252
ANNEXE 1 :.....	255
LES NEURONES CORTICAUX EXPRIMANT LA NNOS ET NK1R SONT REGULES PAR LES PROJECTIONS CHOLINERGIQUES DU CERVEAU ANTERIEUR BASAL.....	255

ANNEXE 2 :.....	283
METABOLIC IMPAIRMENT OF THE ASTROCYTE SERINE SYNTHESIS PATHWAY CONTRIBUTES TO THE DEFICITS OF SYNAPTIC PLASTICITY IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE.....	283
BIBLIOGRAPHIE	315

LISTE DES ABREVIATIONS

2DG : isotope marqué 2-deoxy-D-Glucose	FAD : Flavine Adénine Dinucléotide sous sa forme oxydée
2DG6P : 2-deoxy-D-Glucose-6-Phosphate	FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide sous sa forme réduite
6PGD : 6-PhosphoGluconate Déshydrogénase	FDG : [¹⁸ F]-FluoroDeoxyGlucose
AACD : <i>Aromatic Aminoacid DeCarboxylase</i>	FRET : <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (Transfert d'énergie de fluorescence par résonance)
ABAD : <i>Amyloid Beta peptide Alcool Dehydrogenase</i>	FS : <i>Fast Spiking</i> (Décharge rapide)
AC : Adénylate Cyclase	G1P : Glucose-1-Phosphate
ACoA : Acétyl-Coenzyme-A	G3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate
ADNI : <i>Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative</i>	G6P : Glucose-6-phosphate
ADP : Adénosine DiPhosphate	G6PDH : Glucose 6-Phosphate DésHydrogénase
AGEs : <i>Advanced Glycation End Products</i>	GABA : <i>γ-AminoButyric Acid</i> (Acide γ -aminobutyrique)
AMP : Adénosine MonoPhosphate	GCL : Glutamate-Cystéine-Ligase
AMPA : <i>α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid</i>	GDP : Guanosine DiPhosphate
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique	GLAST : <i>GLutamate ASpartate Transporter</i>
ANP : <i>Adapting Nonpyramidal Neuron</i> (Neurone non-pyramidal à adaptation)	GLT-1 : <i>GLial glutamate Transporter 1</i>
APOE : APolipoprotéine E	GluT : <i>Glucose Transporters</i>
APP : <i>Amyloid Peptide Precursor</i> (peptide précurseur d'amyloïde)	GPCR : <i>G Protein Coupled Receptors</i> (Récepteurs couplés aux protéines G)
ATP : Adénosine TriPhosphate	GR : <i>Glutathion Réductase</i>
BF : <i>Basal Forebrain</i>	GSH : Glutathion réduit
BHE : Barrière Héмато-Encéphalique	GSK-3 : <i>Glycogen Synthase Kinase - 3</i>
BOLD : <i>Blood Oxygen Level Dependant</i>	GSSG : Glutathion oxydé
CA1 : <i>Cornu Ammonis sector 1</i>	GTP : Guanosine TriPhosphate
CAT : Catécholamines	HCN : <i>Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated</i>
CCK : CholeCystoKinine	HK : HexoKinase
CMRglu : <i>Cerebral Metabolic Rate of glucose</i>	IB : <i>Intrinsic Bursting</i> (Décharge en bouffée)
COMT : Catéchol-O-Méthyl Transférase	IP3 : Inositol 1,4,5-triPhosphate
DA : Dopamine	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
DBH : Dopamine β -Hydroxylase	IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
DHAP : DiHydroxyAcétone Phospahte	IS : <i>Irregular Spiking</i> (Décharge inhabituelle)
DIT : <i>Diffusion Imaging Tensor</i>	I_{sAHP} : courant de <i>slow After Hyper-Polarisation</i>
DMN : <i>Default Mode Network</i>	KGDH : <i>alpha-KetoGlutarate DeHydrogenase Complex</i>
EAAT4 : <i>Excitatory AminoAcid Transporter 4</i>	KI : <i>Knock In</i>
EEG : ElectroEncéphaloGramme	LC : <i>Locus Coeruleus</i>
EMT : <i>Extraneuronal Monoamine Transporters</i>	LCRa : Liquide Céphalo-Rachidien artificiel
F1,6BP : Fructose 1,6-BisPhosphate	
F2,6BP : Fructose 2,6-BisPhosphate	
F6P : Fructose-6-Phosphate	

LCS : Liquide CérébroSpinal
LDH : Lactate DésHydrogénase
L-Dopa : DihydrOxyPhénylAlanine Lévogyre
LS : *Late Spiking* (Décharge retardée)
LTP : *Long Term Potentiation*
MAO : MonoAmine Oxydase
MCI : *Mild Cognitive Impairment*
MCT : *MonoCarboxylate Transporters*
MG : MethylGlyoxal
MGS : *Muscular Glycogen Synthase*
NAA : N-Acétyl-Aspartate
NA : Noradrénaline
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NET : *NorEpinephrine Transporters*
NFT : NeuroFibrillary Tangles (enchevêtrements neurofibrillaires)
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
nM : nanoMolaire
NMDA : N-Methyl-D-Aspartate
NO : *Nitric Oxide* (Monoxyde d'azote)
NOS : *Nitric Oxide Synthase*
NPY : NeuroPeptide Y
O-GlcNac : *O-linked β-N-acetylglucosamine*
PA : Potentiel d'Action
PDH : Pyruvate DesHydrogénase
PEP : PhosphoEnolPyruvate
PFC : *Prefrontal Cortex*
PFK : PhosphoFructoKinase
PFKFB : 6-PhosphoFructo-2-Kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase
PFKFB3 : 6-PhosphoFructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase isoforme 3
PI : Phosphatidyl Inositol
PiB : [¹¹C]-Pittsburgh compound-B
kDa : kiloDalton
PK : Pyruvate Kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKC : *Protein Kinase C*
PLC : PhosphoLipase C
PMAT : *Plasma membrane MonoAmine Transporters*
PMCA : *Plasma Membrane Calcium ATPase* (Pompe calcique ATP-dépendante de la membrane plasmique)
PPP : *Pentose Phosphate Pathway* (voie des pentoses phosphates)
PV : ParaValbumine
R5P : Ribulose-5-Phosphate
RA : Récepteurs Adrénériques
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : *Reactive Oxygen Species* (espèces réactives de l'oxygène)
RS : *Regular Spiking* (Décharge habituelle)
RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (Transcription inverse - Réaction de polymérisation en chaîne)
sAHP : *slowAfterHyperPolarization*
sADP : *slowAfterDePolarization*
scRT-PCR : *single cell Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*
sRMN : spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire
sAHP : *slow After Hyper-Polarisation*
SEM : *Standard Error of the Mean*
SERCA : *Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase* (Pompe calcique ATP-dépendante du réticulum endoplasmique)
SOM : SOMatostatine
SUV : *Standardized Uptake Value*
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TH : Tyrosine Hydroxylase
VMA : *VanillylMandelic Acid*
VMAT : *Vesicular MonoAmine Transporter* (Transporteur vésiculaire de monoamines)
VIP : *Vasoactive Intestinal Peptide* (Peptide intestinal vasoactif)

LISTE DES FIGURES et TABLEAUX

Figure 1 : Lobes composants le néocortex humain	24
Figure 2 : Les aires corticales définies par Korbinian Brodmann	26
Figure 3 : Le néocortex est organisé en six couches	28
Figure 4 : Organisation des colonnes corticales chez le rongeur	29
Figure 5 : Les grands types de cellules gliales du SNC	31
Figure 6 : Représentation schématique de l'activation microgliale	32
Figure 7 : Schéma d'un oligodendrocyte formant une gaine de myéline autour d'un axone..	33
Figure 8 : Les différents types d'astrocytes du cortex par Ramón y Cajal	34
Figure 9 : Dessin de neurones par Ramón y Cajal	35
Figure 10 : Diversité morphologique des interneurons du néocortex	37
Figure 11 : Caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques de quatre types d'interneurones	39
Figure 12 : Représentation de cellules pyramidales du néocortex	41
Figure 13 : Epines dendritiques de cellule pyramidale	42
Figure 14 : Profils de décharge de neurones pyramidaux	43
Figure 15 : Budget énergétique dans la substance grise.....	53
Figure 16 : Etapes du fonctionnement de la pompe Na/K ATPase.....	55
Figure 17 : Mécanismes synaptiques consommateurs d'énergie.....	57
Figure 18 : Structure secondaire des transporteurs du glucose	60
de la superfamille des GluTs.....	60
Figure 19 : Distribution périvasculaire de GluT1	61
Figure 20 : Localisation cellulaire des principaux transporteurs cérébraux du glucose	64
Figure 21 : Schéma récapitulatif des réactions de la glycolyse.....	68
Figure 22 : Représentation schématique des réactions impliquées dans le métabolisme du glucose.....	71

Figure 23 : Les étapes du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique)	74
Figure 24 : Les composants de la chaîne respiratoire mitochondriale	76
Figure 25 : Les astrocytes recouvrent la totalité du lit vasculaire	78
Figure 26 : Hypothèse historique de la navette du lactate : activation de la glycolyse astrocytaire par le glutamate	80
Figure 28 : Voie de production et d'élimination des ROS.....	86
Figure 29 : Rôle des astrocytes dans la protection des neurones contre le stress oxydant.....	87
Schéma bilan : Métabolisme du glucose neuronal en condition normale	89
Figure 30 : Lésions caractéristiques de la MA visualisées par immunohistochimie sur tranche de cortex	91
Figure 31 : Stades de Braak associés à la progression des lésions d'accumulations protéiques dans la MA	93
Figure 32 : Le clivage anormal de l'APP conduit à la production du peptide amyloïde	95
Figure 33 : Etude de marqueurs de l'intégrité cellulaire et du métabolisme par spectroscopie RMN du proton ¹ H	97
Figure 34 : La TEP utilise une molécule biologique marquée par un radio-isotope émetteur de positrons	99
Figure 35 : Quantification des plaques amyloïdes cérébrales par imagerie PiB-TEP d'un sujet contrôle et d'un sujet atteint de MA	102
Figure 36 : IRM structurelle d'un sujet sain et d'un patient atteint de la MA	104
Figure 37 : FDG-TEP et PiB-TEP d'un sujet contrôle et d'un sujet atteint de MA.....	108
Figure 38 : Prédisposition génétique à la maladie d'Alzheimer	111
Figure 39 : Génération des souris 3xTg-AD	119
Figure 40 : Fonctionnement du biosenseur FLII12Pglu700μΔ6.....	121
Schéma bilan : Altération du métabolisme du glucose neuronal dans la MA.....	175
Figure 41 : Localisation des noyaux noradrénergiques du système nerveux central	185
Figure 42 : Diversité morphologique des neurones du <i>Locus Coeruleus</i>	186
Figure 43 : Projections des neurones noradrénergiques dans le système nerveux central ...	187
Figure 44 : Innervation du néocortex par les fibres noradrénergiques.....	189

Figure 45 : Voie de synthèse de la noradrénaline	191
Figure 46 : Varicosité axonale d'un neurone noradrénergique projetant dans le cortex	192
Figure 47 : Localisation subcellulaire des transporteurs des CAT.....	194
Figure 48 : Voie de dégradation de la noradrénaline.	195
Figure 49 : Distribution cérébrale des récepteurs α_{1a} (Haut), α_{1b} (Milieu) et α_{1d} (Bas)	198
Figure 50 : Distribution cérébrale des récepteurs β_1 (gauche) et β_2 (droite).....	200
Figure 51 : Affinité des trois types de RA pour la noradrénaline	202
Figure 52 : Classification actuelle des récepteurs noradrénergiques	203
Figure 53 : Localisation des récepteurs noradrénergiques au niveau des terminaisons synaptiques	205
Figure 54 : Protéines G et voies de signalisations associées aux récepteurs noradrénergiques	206
Figure 55 : La stimulation des RA- β augmente la fréquence et l'amplitude des sEPSC.....	210
Figure 56 : La NA stimule l'excitabilité des cellules pyramidales en inhibant la sAHP.....	214
Figure 57 : Implication des RA- β dans la modulation de la sAHP par la NA	216
Figure 58 : Protocole d'induction de la sAHP dans les cellules pyramidales corticales des couches II-III du cortex somatosensoriel de souris	227
Figure 59 : La noradrénaline réduit l'adaptation de fréquence de décharge des PA et la sAHP dans les neurones pyramidaux des couches II-III du cortex somatosensoriel de souris.	234
Figure 60 : Inhibition de la sAHP induite par différents agonistes adrénergiques	236
Figure 61 : Dans les cellules pyramidales, l'amplitude du courant IsAHP décroît au cours du temps	238
Figure 62 : La NA inhibe IsAHP de manière dose-dépendante.....	240
Figure 63 : L'effet de la NA sur IsAHP n'est pas dû à un effet de réseau	241
Figure 64 : Inhibition de IsAHP par les agonistes α_1 et β adrénergiques	243

Liste des publications

Article 1 (en préparation) :

Early alterations of supragranular pyramidal cells glucose metabolism in a mouse model of Alzheimer's disease

Juliette Piquet, Xavier Toussay, Régine Hepp, Rodrigo Lerchundi, Juliette Ledouce, Émilie Faivre, Elvire Guiot, Gilles Bonvento, Bruno Cauli

Article 2 (publié dans Cerebral Cortex) :

Cortical nNOS/NK1 Receptor Neurons are Regulated by Cholinergic Projections From the Basal Forebrain

Rhiannan H. Williams, Jacqueline Vazquez-DeRose, Alexia M. Thomas, Juliette Piquet, Bruno Cauli and Thomas S. Kilduff

Article 3 (en révision à Nature Communications) :

Metabolic impairment of the astrocyte serine synthesis pathway contributes to the deficits of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease

Juliette Le Douce, Julien Veran, Emilie Faivre, Pierrick Jégo, Xavier Toussay, Michel Vandenberghe, Yaël Balbastre, Marianne Maugard, Juliette Piquet, Elvire Guiot, Nguyet Thuy Tran, Myriam Taverna, Anne-Sophie Hérard, Thierry Delzescaux, Philippe Hantraye, Emmanuel Brouillet, Bruno Cauli, Stéphane H.R. Oliet, Aude Panatier and Gilles Bonvento

Résumé

Mes travaux de thèse se sont portés sur les cellules pyramidales du cortex somatosensoriel de rongeur, en condition normale et pathologique.

L'altération précoce du métabolisme du glucose est une caractéristique fonctionnelle invariante de la MA qui pourrait être à l'origine des dysfonctionnements synaptiques et de la neurodégénérescence tardive associés à la maladie.

Afin de mieux comprendre la pathogenèse de la MA, j'ai cherché à clarifier les mécanismes responsables de l'hypométabolisme précoce du glucose observé dans la maladie.

Mes travaux ont permis de mettre à jour des altérations dans les flux métaboliques du glucose chez un modèle murin de la MA à un stade asymptomatique juvénile. Mes données d'imagerie cellulaire ont mis en évidence une augmentation du flux glycolytique associée à une diminution de l'activité de la voie des PPP¹ dans les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD sans altération du transport du glucose.

Le système noradrénergique exerce une profonde influence sur les processus cognitifs. Une partie de ma thèse a été consacrée à éclaircir les effets de la NA sur la modulation de l'excitabilité des cellules pyramidales dans le cortex somatosensoriel de souris.

Mes résultats montrent que les agonistes $\alpha 1$ et β adrénergiques inhibent les courants responsables de la sAHP² et suggèrent un effet coopératif des récepteurs $\alpha 1$ et β noradrénergiques. L'implication des RA- $\alpha 1$ dans la genèse d'une dépolarisation lente (sADP³) reste à déterminer. Ces deux phénomènes convergeraient vers une dépolarisation accrue de la membrane du neurone, facilitant une nouvelle décharge de potentiel d'action.

PPP : *Pentoses Phosphate Pathway*

sAHP : *slow After Hyperpolarisation*

sADP : *slow After DePolarisation*

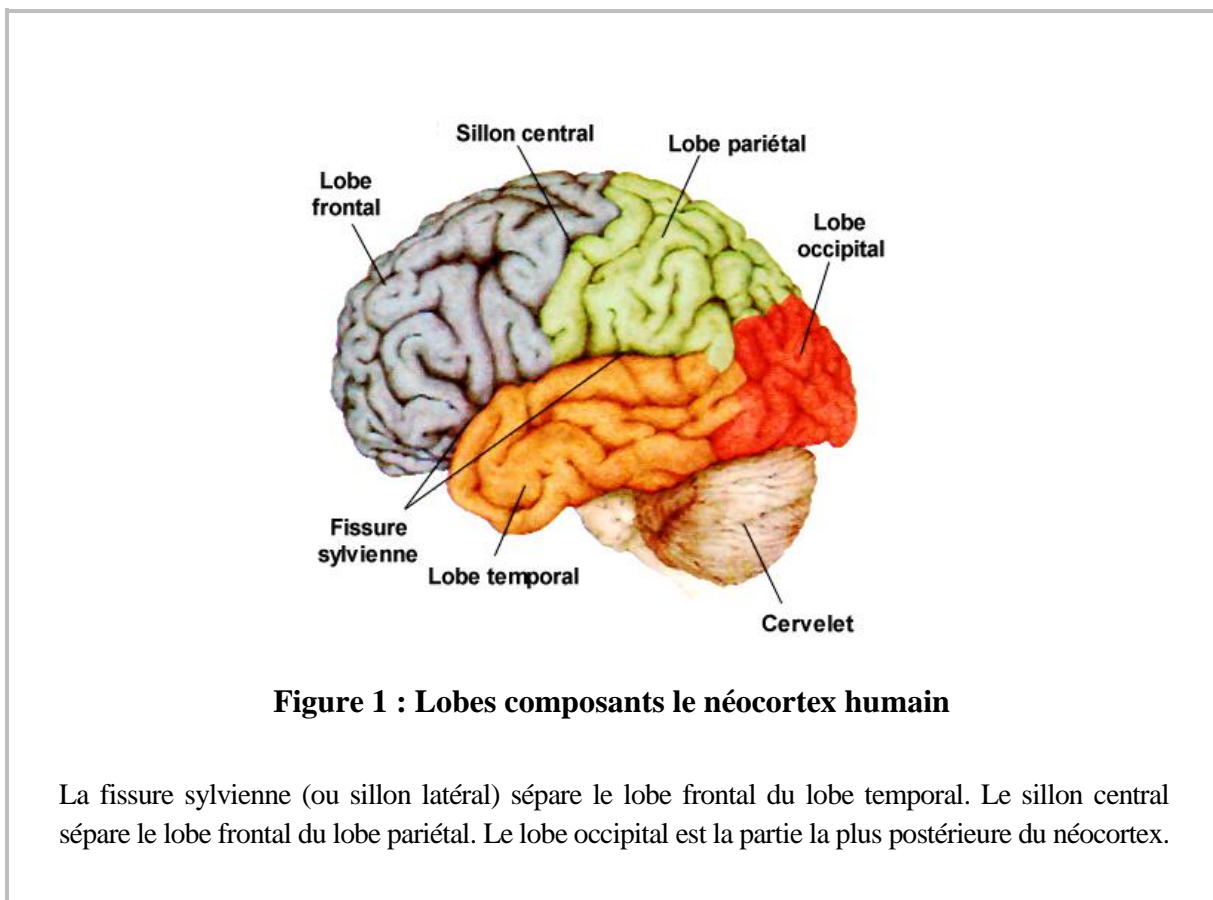
Partie 1 :

Le Néocortex comme structure d'intérêt

Structure du système nerveux central acquise le plus récemment au cours de l'évolution, le néocortex est impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales. Il joue notamment un rôle dans la perception du monde extérieur, le contrôle des mouvements volontaires ou encore dans des processus cognitifs complexes tels que le langage, l'imagination ou la conscience.

I. Anatomie externe du néocortex

Originaire du télencéphale, il apparaît avec les mammifères et forme la partie la plus superficielle du cerveau. D'aspect lisse chez les mammifères dits "primitifs" (lissencéphales), le néocortex des mammifères dits "supérieurs" (gyrencéphales) comporte de nombreux sillons et circonvolutions (**Figure 1**).



A. Aires corticales et fonctions cognitives associées

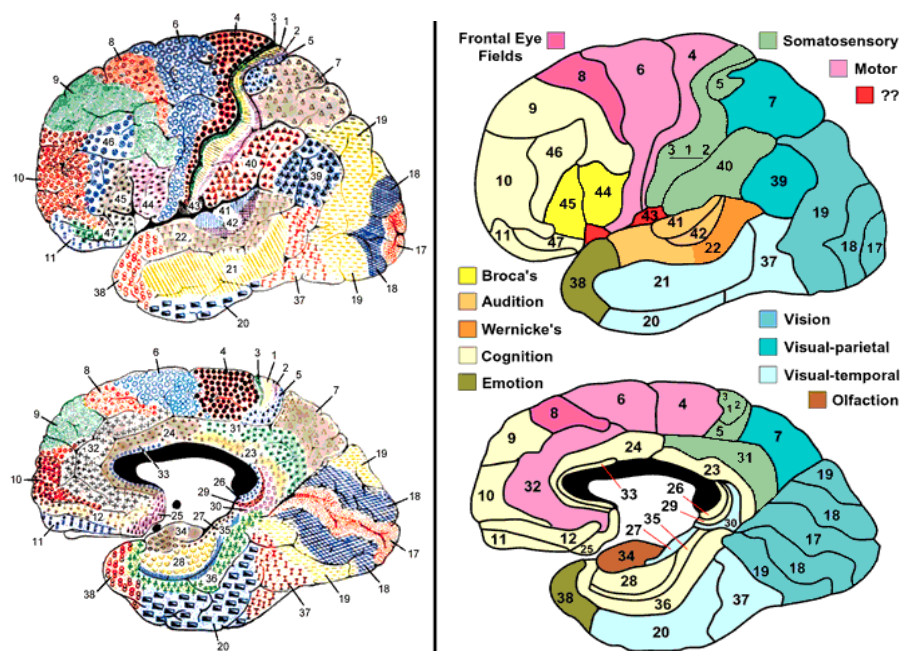
Le néocortex est la partie la plus superficielle de l'encéphale. Il est constitué de deux hémisphères cérébraux et est délimité par des sillons et des fissures. Ces caractéristiques anatomiques permettent de cartographier quatre lobes distincts (**Figure 1**) : le lobe frontal, qui comprend l'aire motrice principale responsable de la genèse des mouvements volontaires ; le lobe pariétal (séparé du lobe frontal par le sillon central), impliqué dans la somesthésie ; le lobe occipital comprenant les aires visuelles et enfin, replié vers l'avant, le lobe temporal, impliqué dans l'audition et la mémoire (Connors et al., 1997).

Certaines de ces aires corticales ont leur équivalent chez les mammifères plus « primitifs ». Chez la souris par exemple, l'aire sensorimotrice est l'équivalent humain des aires somesthésiques et motrices. C'est au niveau de cette aire que les différents travaux réalisés pendant ma thèse ont été conduits.

B. Processus cognitifs régionalisés

Au cours du XIX^{ème} siècle, le neurologue français Paul Broca a pu associer certaines fonctions cérébrales à une portion localisée du néocortex. La description *post mortem* du cerveau d'un de ses patients lui a permis de faire le lien entre une lésion du lobe frontal gauche et l'incapacité de son patient à parler. En multipliant ses observations sur d'autres cas, Paul Broca fit le lien entre le lobe frontal gauche et le langage. En 1873, Wernicke, un confrère allemand, étudiait un patient ayant subi une attaque cérébrale. Bien que l'homme fût capable de parler et d'entendre, il pouvait à peine comprendre ce que les gens lui disaient à l'oral ou par écrit. Après sa mort, le neurologue découvrit une lésion au niveau de la région temporo-pariétale postérieure gauche. Il conclut que cette région, qui était proche de l'aire auditive, était impliquée dans la compréhension du langage.

Ces travaux révélèrent que commande motrice du langage et compréhension des mots faisaient intervenir deux régions cérébrales bien distinctes, annonçant l'existence d'une régionalisation des processus cognitifs complexes.



Cartographie originale colorisée

Schémas des attributions fonctionnelles

Figure 2 : Les aires corticales définies par Korbinian Brodmann

Subdivision du néocortex humain en 52 aires selon leurs propriétés cytoarchitecturales et fonctionnelles. Haut : vue latérale. Bas : vue parasagittale.

En 1909, le neuroanatomiste allemand Korbinian Brodmann divise le cortex en 52 aires en se basant sur la taille des neurones, leur densité, le nombre de couches présentes dans chaque région et l'abondance des axones myélinisés. Il élargit alors l'hypothèse de Paul Broca en postulant qu'à chaque aire corticale correspond une fonction spécifique. Ces fonctions sont regroupées en trois groupes : motrices, sensorielles et associatives (**Figure 2**).

A la fin du XX^{ème} siècle, la mise au point des techniques d'imagerie cérébrale non invasives comme l'IRMf⁴ ou encore la TEP⁵ a permis de valider cette théorie.

⁴ IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

⁵ TEP : Tomographie par Emission de Positons

II. Structure interne du néocortex

Le néocortex est divisé en deux parties superposées. A la surface du cerveau se trouve la substance grise, caractérisée par la présence d'un grand nombre de corps cellulaires. En profondeur se trouve la substance blanche. Délimitée par les ventricules et le striatum, elle est essentiellement composée de fibres nerveuses myélinisées.

La suite de ce manuscrit portera uniquement sur la substance grise du néocortex.

A. Organisation en couches horizontales

Le néocortex est organisé en six couches. Au milieu du XIX^{ème} siècle, l'allemand Theodor Meynert réalise le premier dessin de la structure laminaire d'un cortex (*pour revue, voir Jones, 1984*). L'avancée des techniques de coloration, notamment l'imprégnation au nitrate d'argent de Golgi, la coloration de Nissl et la coloration des fibres myélinisées ont permis de décrire plus précisément sa cytoarchitecture (**Figure 3**).

Du point de vue histologique, la substance grise est composée de six couches distinctes parallèles à la surface du néocortex. L'épaisseur de chaque couche peut varier en fonction des aires corticales. Au niveau du cortex moteur, par exemple, la couche **IV** va jusqu'à disparaître au profit d'une couche **V** très développée.

La couche **I**, la plus superficielle, se situe juste sous la pie-mère. Aussi appelée couche moléculaire ou couche plexiforme, elle est en grande partie composée de fibres nerveuses. On y trouve toutefois quelques corps cellulaires de neurones. Les couches **II-III**, appelées respectivement couche granulaire externe et couche pyramidale externe, contiennent de nombreux corps cellulaires de neurones. La couche granulaire interne, ou couche **IV**, est densément peuplée de cellules à l'aspect étoilé et épineux (cellules en grain) mais pauvre en cellules pyramidales. La couche **V**, nommée couche ganglionnaire ou pyramidale interne, regroupe les grandes cellules pyramidales du néocortex. Enfin, la couche **VI** autrement appelée couche polymorphe, tire son nom de ses cellules aux formes irrégulières (**Figure 3**).

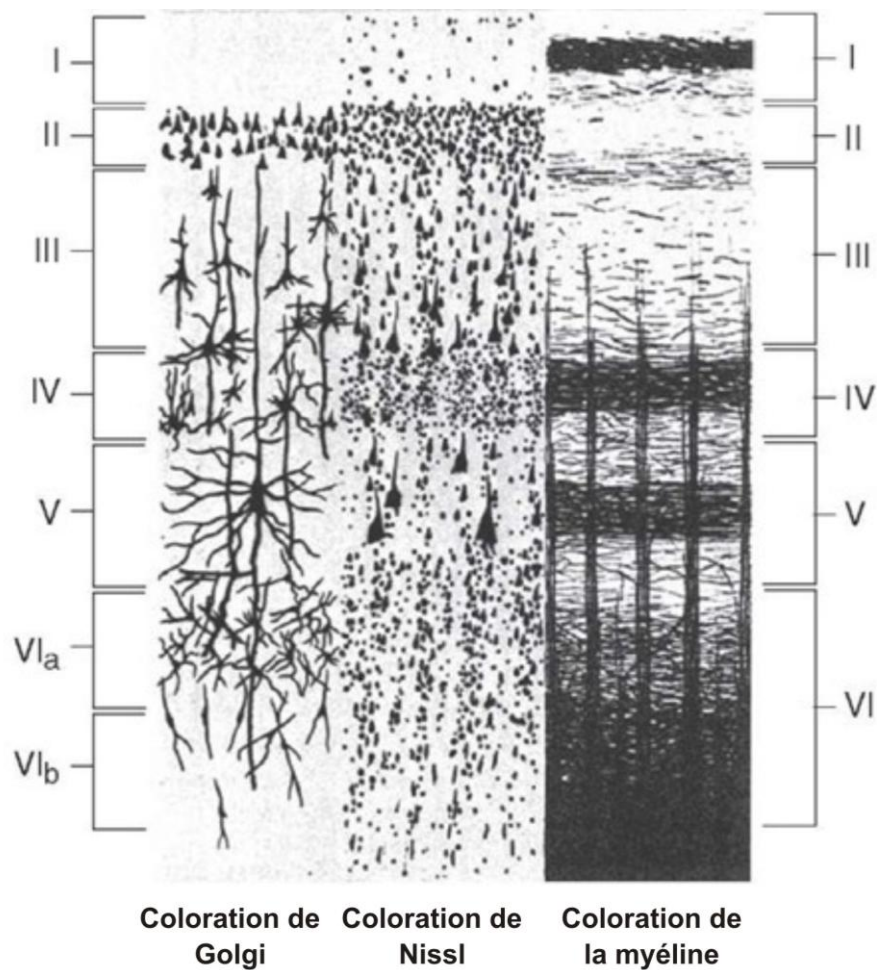


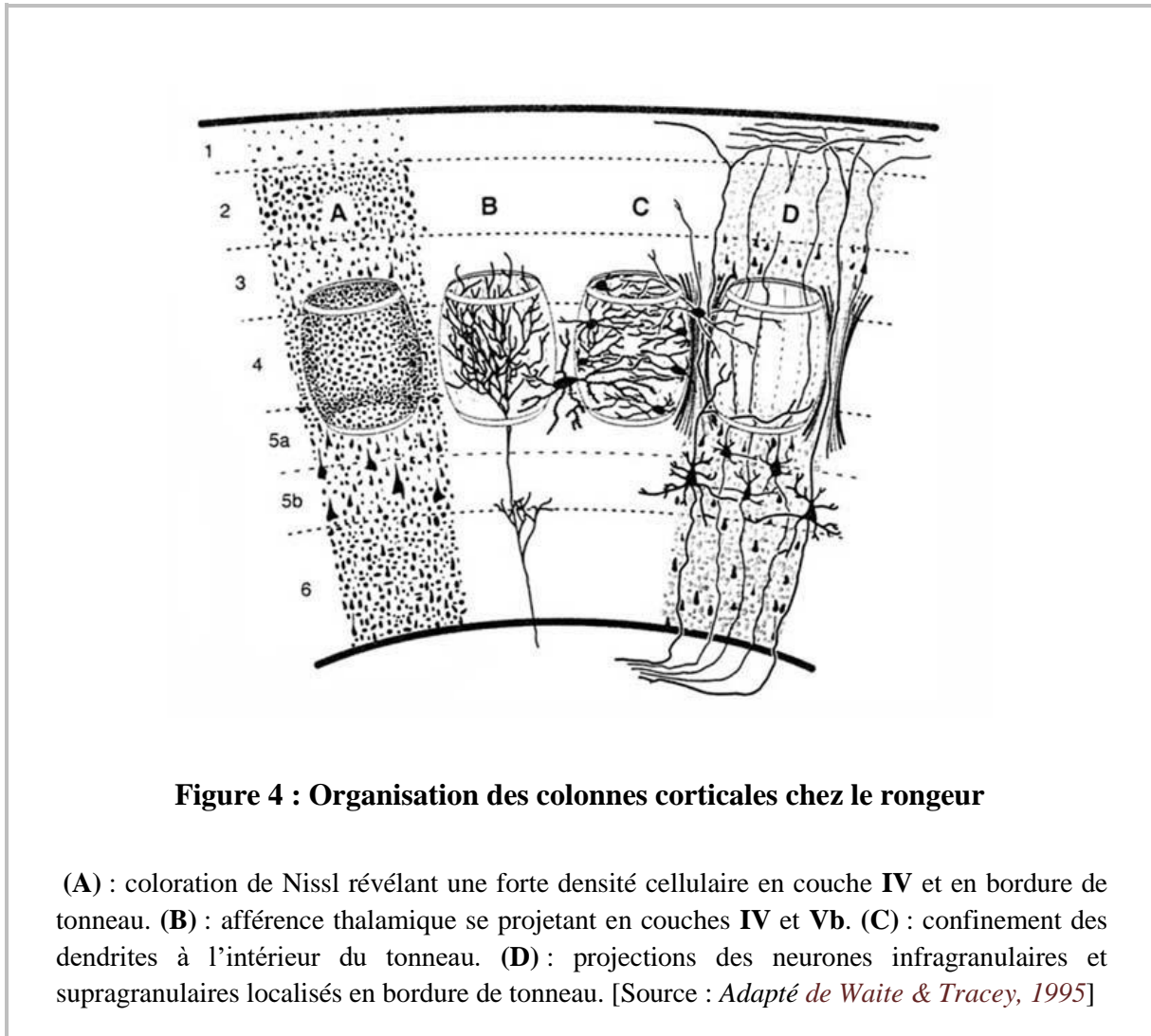
Figure 3 : Le néocortex est organisé en six couches

Illustration représentant des sections de coupes perpendiculaires à la surface corticale, observées après traitement par différentes techniques de coloration. La coloration de Golgi marque à la fois les cellules et leurs prolongements. La coloration de Nissl marque uniquement les corps cellulaires. La coloration de la myéline met en évidence les axones myélinisés.

D'un point de vue fonctionnel, le néocortex est regroupé en trois couches distinctes. La couche supragranulaire, formée des couches **I à III**, envoie des projections vers d'autres aires corticales. La couche granulaire (couche **IV**) reçoit la grande majorité des afférences sensorielles du thalamus. Les couches **V-VI** forment la couche infragranulaire et se projettent vers les zones extra-corticales (Lee and Winer, 2008a, 2008b ; Linden and Schreiner, 2003).

B. Organisation en colonnes fonctionnelles verticales

En 1957, Vernon B. Mountcastle réalise des enregistrements *in vivo* dans le néocortex de chats. Il montre que les neurones répondant à une stimulation localisée de récepteurs sensoriels périphériques sont regroupés en colonnes fonctionnelles (Mountcastle, 1957).



Ces colonnes (ou tonneaux) ont un diamètre compris entre 300 et 600 μm et s'étendent perpendiculairement à la surface piale de la couche **II** jusqu'à la couche **VI**. Elles contiennent plusieurs milliers de neurones et sont elles-mêmes constituées d'un assemblage d'unités de base appelées mini-colonnes (Mountcastle, 1997). Les colonnes corticales sont des unités

complexes de traitement et de distribution de l'information qui lient ensemble un grand nombre d'entrées et de sorties synaptiques via un processus complexe d'intégration interne.

La forme et la taille des colonnes varient suivant les espèces ; chez le rongeur par exemple, elles sont particulièrement développées au niveau du cortex somatosensoriel (**Figure 4**). Chaque colonne est composée d'un grand nombre de cellules en étroite relation.

III. Diversité cellulaire du néocortex

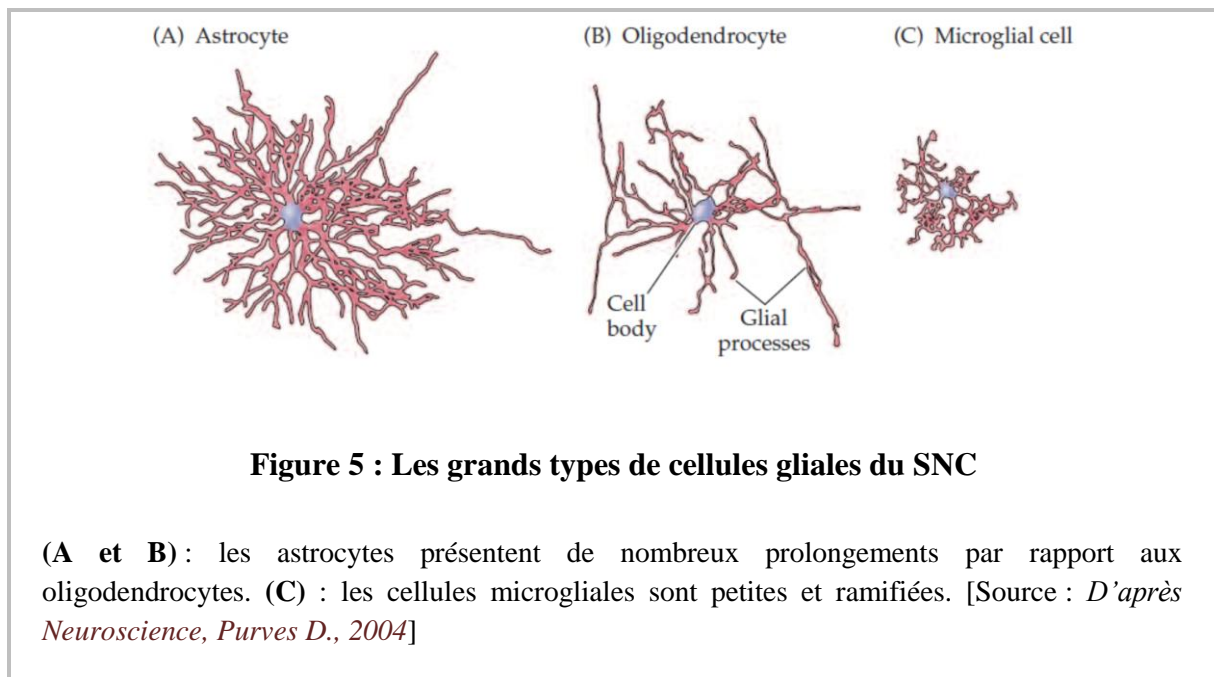
Les fonctions cognitives du néocortex sont permises par une collaboration entre les cellules gliales, les cellules nerveuses et le système vasculaire (dont il ne sera pas question ici).

A. Les cellules gliales

Ces cellules sont les représentantes majoritaires du système nerveux. Suivant les aires cérébrales, on estime qu'il y a jusqu'à dix fois plus de glies que de neurones (Lent et al., 2012).

Au début du XX^{ème} siècle, trois groupes de cellules gliales sont identifiés dans le système nerveux central (**Figure 5**). Ces types cellulaires diffèrent par leur origine développementale. Les astrocytes et les oligodendrocytes proviendraient du neuroectoderme, (comme les neurones), tandis que la microglie serait d'origine vitelline (Ginhoux et al., 2010 ; Schulz et al., 2012).





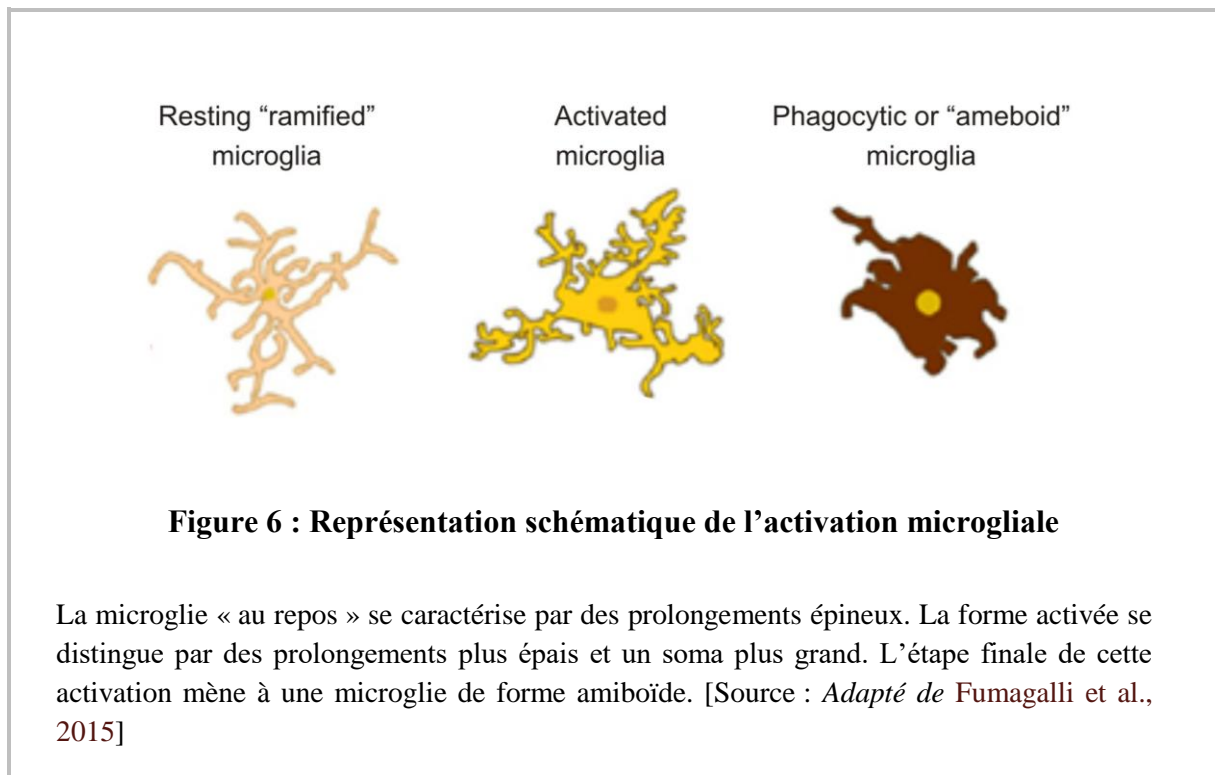
Etymologiquement le terme glie (*glia*) signifie « colle » en grec, car on a initialement attribué à ces cellules un rôle de soutien (Virchow, 1846). On sait aujourd'hui que les glies assurent d'autres fonctions essentielles comme l'installation et le maintien de la barrière hémato-encéphalique, la myélinisation, le maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire, le couplage neurovasculaire ou encore le métabolisme (ce dernier point sera développé dans le chapitre 2 de ce manuscrit).

1. La microglie

Les cellules microgliales sont mobiles et très polymorphes ; leurs nombreux prolongements cytoplasmiques s'alignent le long des faisceaux nerveux.

Il existe plusieurs types de microglie ; leur phénotype dépend de leur micro-environnement et de leur stade de développement. La microglie amiboïde (forme « activée ») se distingue de la microglie ramifiée (« au repos ») par sa capacité de phagocytose et de migration. En effet, elle peut également exprimer certains facteurs trophiques ou des marqueurs spécifiques des macrophages (**Figure 6**). Cette microglie est essentiellement présente au cours du développement mais peut réapparaître dans le parenchyme adulte lors de lésions, d'infections

ou de pathologie, comme la maladie d'Alzheimer. La microglie ramifiée est le stade mature de la microglie au repos.

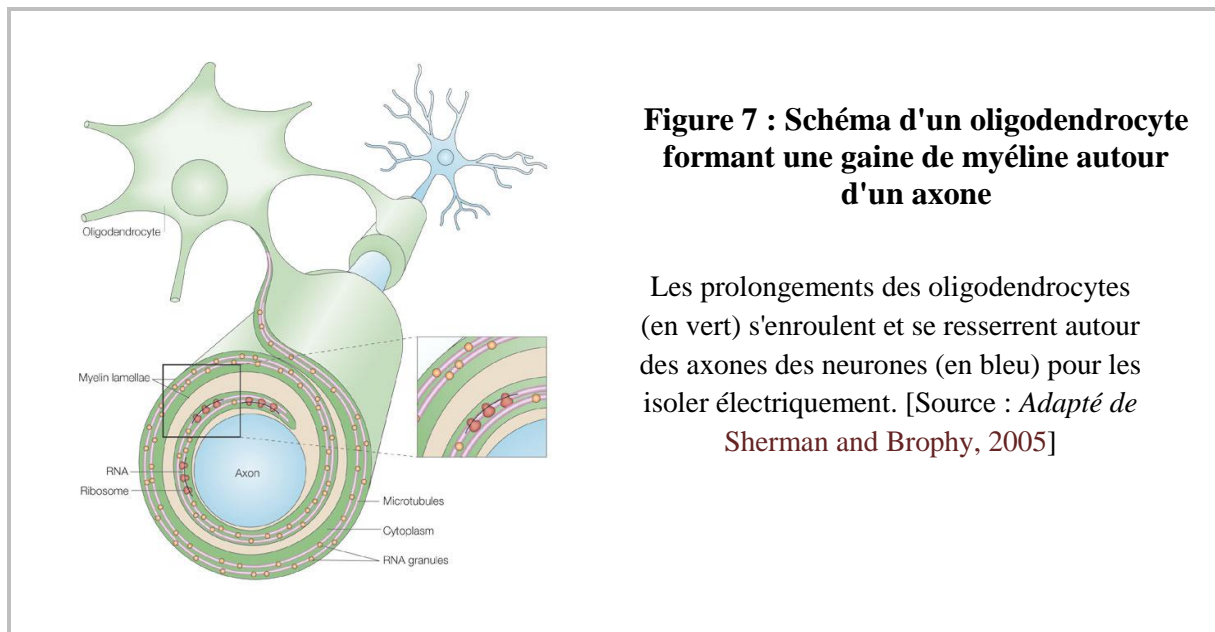


Dans le système nerveux central adulte, les cellules microgliales permettent d'éliminer les débris et les substances étrangères pouvant pénétrer dans le cerveau par le liquide céphalorachidien ou la circulation sanguine. En réponse à une agression, l'activation de la microglie constitue la première réponse cellulaire.

2. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules peu ramifiées qui se différencient après la mise en place des faisceaux axonaux et la fin de la technique d'imagerie cérébrale (**Figure 7**). Leur fonction principale est de synthétiser une gaine de myéline autour de l'axone de nombreux neurones du système nerveux central. Celle-ci isole électriquement les axones et permet une conduction très rapide de l'influx nerveux mais joue également un rôle de soutien

métabolique pour les axones (Lee et al., 2012). Les cellules de Schwann jouent ce rôle dans le système nerveux périphérique.



3. Les astrocytes

Les astrocytes (*astro*, étoile et *cyte*, cellule) sont des cellules de forme généralement étoilée (**Figure 5**) et dont la morphologie est très hétérogène (**Figure 8**).

Il existe des astrocytes avec de très longs prolongements dans la substance blanche du néocortex (certains atteignent la couche **III**). Ils sont également présents dans la couche **I** et forment une structure sur laquelle les artères piales reposent : la *glia limitans*. Les astrocytes aux prolongements courts sont présents en abondance dans la substance grise.

Les astrocytes peuvent avoir de multiples contacts entre les différents types cellulaires ainsi que sur les vaisseaux sanguins (Kacem et al., 1998 ; Mathiisen et al., 2010) en y projetant leurs pieds astrocytaires. Ce sont des constituants de la barrière hémato-encéphalique (Zlokovic, 2008). Ils jouent un rôle dans la régulation du métabolisme neuronal et dans l'apport énergétique (McEwen and Reagan, 2004 ; Pellerin, 2005 ; Pellerin and Magistretti, 1994 ; Rouach et al., 2008) (Ce rôle sera abordé dans le chapitre 2 de ce manuscrit).

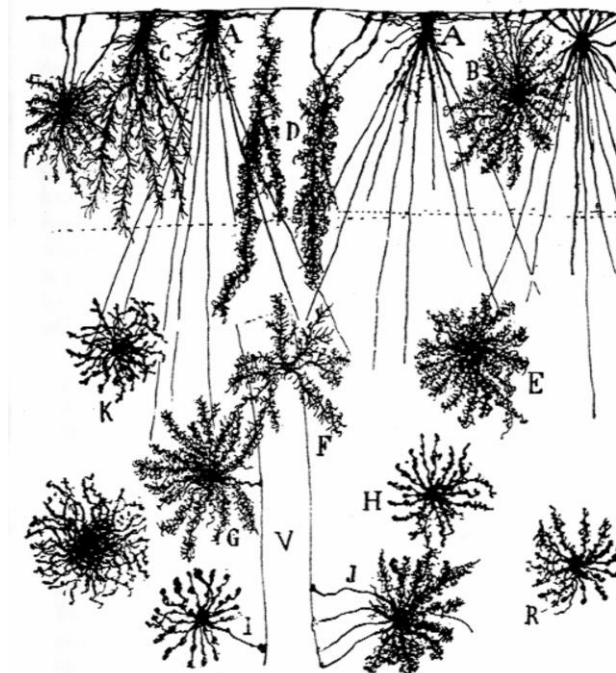


Figure 8 : Les différents types d'astrocytes du cortex par Ramón y Cajal

Les astrocytes **A**, **B**, **C** et **D** sont présents dans la couche moléculaire. Les astrocytes **E**, **F**, **G** et **H** font partie des couches **II-III**. Les astrocytes **I** et **J** envoient leurs prolongements au niveau du vaisseau (**V**). [Source : *Adapté de Ramón y Cajal, 1899*]

Les astrocytes qui entourent les zones synaptiques sont impliqués dans la recapture de certains neurotransmetteurs comme le glutamate (Voutsinos-Porche et al., 2003) ou dans l'homéostasie du potassium (Walz, 2000; Wang et al., 2012). Ils ont aussi la capacité de libérer des molécules comme le glutamate, la D-sérine, l'ATP⁶ ou encore le GABA⁷ ; on parle alors de gliotransmission (Perea et al., 2009).

⁶ ATP : Adénosine TriPhosphate

⁷ GABA : *γ-AminoButyric Acid*

B. Les neurones

A la fin du XIX^{ème} siècle, les travaux de Camillo Golgi et de Santiago Ramón y Cajal ont permis de grandes avancées dans l'étude des populations de neurones du cortex. En améliorant la technique histologique d'imprégnation au nitrate d'argent de Golgi, Ramón y Cajal a mis à jour l'extraordinaire diversité morphologique des neurones corticaux (**Figure 9**). A la fin du XX^{ème} siècle, de nouvelles techniques d'immunocytochimie, d'hybridation *in situ*, d'électrophysiologie par patch-clamp (Edwards et al., 1989 ; Stuart et al., 1993) ou encore de RT-PCR⁸ sur cellule unique (Lambolez et al., 1992) ont été mises au point et les descriptions morphologiques des neurones ont été enrichies de connaissances électrophysiologiques et moléculaires.

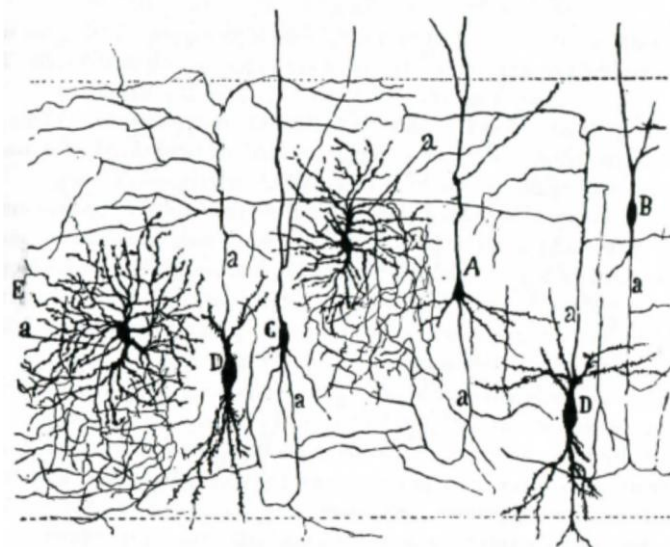


Figure 9 : Dessin de neurones par Ramón y Cajal

Marquage du cortex visuel de chat par méthode de Golgi. (A, B et C) : neurones pyramidaux et fusiformes présentant un axone descendant et arqué. (D) : cellule fusiforme à large soma avec un axone ascendant. (E) : cellule neurogliaforme. (a) : axone. [Source : *Adapté de Ramón y Cajal, 1899*]

⁸ RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

Les neurones sont des cellules excitables et polarisées (en ce sens qu'ils présentent une organisation et des fonctions différentes à chacune de leurs extrémités). Ils sont également dotés d'un métabolisme particulier (Pellerin and Magistretti, 1994 ; Rodriguez-Rodriguez et al., 2012) dont il sera question dans le chapitre 2.

Contrairement aux cellules gliales, les neurones sont des cellules postmitotiques : après la naissance, ils ne peuvent plus entrer dans la phase G1 du cycle mitotique et arrêtent de se diviser (à l'exception des cellules de la muqueuse olfactive et des grains de l'hippocampe) (Cameron and McKay, 1999).

Classiquement, on distingue deux types de neurones : les excitateurs (cellules pyramidales et cellules étoilées) et les inhibiteurs dont la plupart ont des axones courts et sont autrement appelés interneurones.

1. Les interneurones

Les interneurones inhibiteurs sont présents dans toutes les couches du néocortex et constituent environ 20% des neurones corticaux (Gabbott and Somogyi, 1986). Ces cellules libèrent le GABA comme neurotransmetteur et possèdent une arborisation dendritique généralement confinée au niveau d'une couche corticale spécifique (**Figure 10**) (Houser et al., 1983) bien que l'on puisse en rencontrer quelques-unes avec des projections longues (Tomioka et al., 2005; Tomioka and Rockland, 2007).

Il existe une très grande diversité morphologique des interneurones (DeFelipe and Fariñas, 1992). On distingue des interneurones unipolaires, bipolaires ou multipolaires selon le nombre de dendrites principales qui émergent de leur corps cellulaire (Porter et al., 1998). Contrairement aux cellules excitatrices, ils présentent très peu d'épines au niveau de leurs dendrites. La forme du soma est aussi hétérogène et dépend souvent du nombre et de l'orientation des dendrites primaires (**Figure 10**).

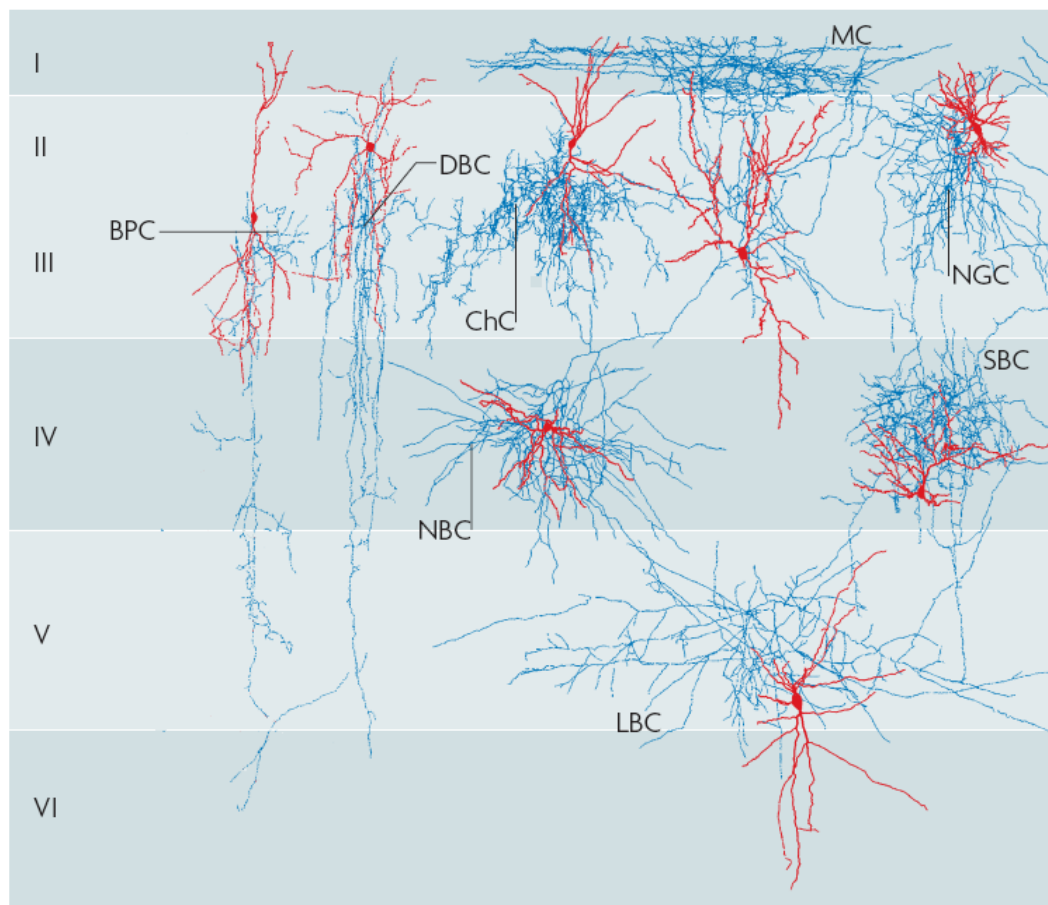


Figure 10 : Diversité morphologique des interneurons du néocortex

Reconstruction de différentes classes d'interneurons néocorticaux. Les axones sont représentés en bleu et les dendrites en rouge. Les couches corticales sont représentées à gauche de la figure. L'arborisation axonale :

BPC : cellule bipolaire ; **DBC** : cellule à double bouquet ; **NBC** : cellule à panier nichée ; **ChC** : cellule en chandelier ; **LBC** : cellule à panier large ; **MC** : cellule de Martinotti ; **NGC** : cellule neurogliaforme ; **SBC** : petite cellule à panier [Source : *Adapté de Huang et al., 2007*]

A cette diversité morphologique s'ajoute une diversité électrophysiologique et neurochimique (**Figure 11**) (Petilla Interneuron Nomenclature Group et al., 2008). Certaines protéines de liaison au calcium comme la PV⁹ ou encore certains neuropeptides comme la SOM¹⁰, le VIP¹¹

⁹ PV : ParaValbumine

¹⁰ SOM : SOMatostatine

ou le NPY¹² sont sélectivement exprimés par les interneurones et peuvent être utilisés comme marqueurs moléculaires.

De nombreux travaux basés à la fois sur les critères anatomiques, biochimiques et électrophysiologiques ont permis de regrouper les interneurones en grandes catégories (Cauli et al., 2000 ; Gallopin et al., 2005 ; Karagiannis et al., 2009 ; Kawaguchi and Kubota, 1997).

Les interneurones à SOM et à PV sont les plus abondants (Cauli et al., 1997). Les premiers présentent un profil de décharge de type RS (**Figure 11, C1**) tandis que les seconds possèdent un profil de décharge de type FS¹³ caractérisé par une décharge rapide de PA sans adaptation de fréquence (**Figure 11, B1**) (Kawaguchi and Kubota, 1997). Une troisième classe particulièrement représentée est constituée des interneurones exprimant le VIP. Ces cellules présentent deux profils de décharge de PA distincts : soit des décharges adaptantes (ANP¹⁴) (**Figure 11, D1**) soit des bouffées de PA émises à intervalles de temps irréguliers (IS¹⁵) (**Figure 11, E1**) (Cauli et al., 1997 ; Kawaguchi and Kubota, 1997 ; Peters and Harriman, 1988 ; Porter et al., 1998). La liste n'est pas exhaustive et d'autres types d'interneurones ont été mis en évidence. Ceux exprimant la CCK¹⁶ ou encore le NPY par exemple (Galarreta et al., 2004 ; Karagiannis et al., 2009 ; Kawaguchi, 1995 ; Kawaguchi and Kubota, 1997 ; Tamás et al., 2003). Cette diversité morphologique, moléculaire et électrophysiologique suggère une spécificité fonctionnelle au sein des interneurones.

Cependant, une variabilité importante est observée entre les cellules regroupées dans une même classe. Les profils d'expressions des différents marqueurs ne sont pas hermétiquement ségrévés, mais se recouvrent partiellement au sein de la population (Nassar et al., 2015). Les propriétés individuelles et la connectivité synaptique sont également très variables (Petilla Interneuron Nomenclature Group et al., 2008). A défaut de catégories bien distinctes il semblerait qu'il existe plutôt un continuum fonctionnel des phénotypes d'interneurones (Battaglia et al., 2013) dont les rôles au sein du néocortex ne seront pas présentés ici.

¹¹ VIP : *Vasoactive Intestinal Peptide*

¹² NPY : *Neuropeptide Y*

¹³ FS : *Fast Spiking*

¹⁴ ANP : *Adapting Nonpyramidal Neuron*

¹⁵ IS : *Irregular Spiking*

¹⁶ CCK : *CholeCystoKinine*

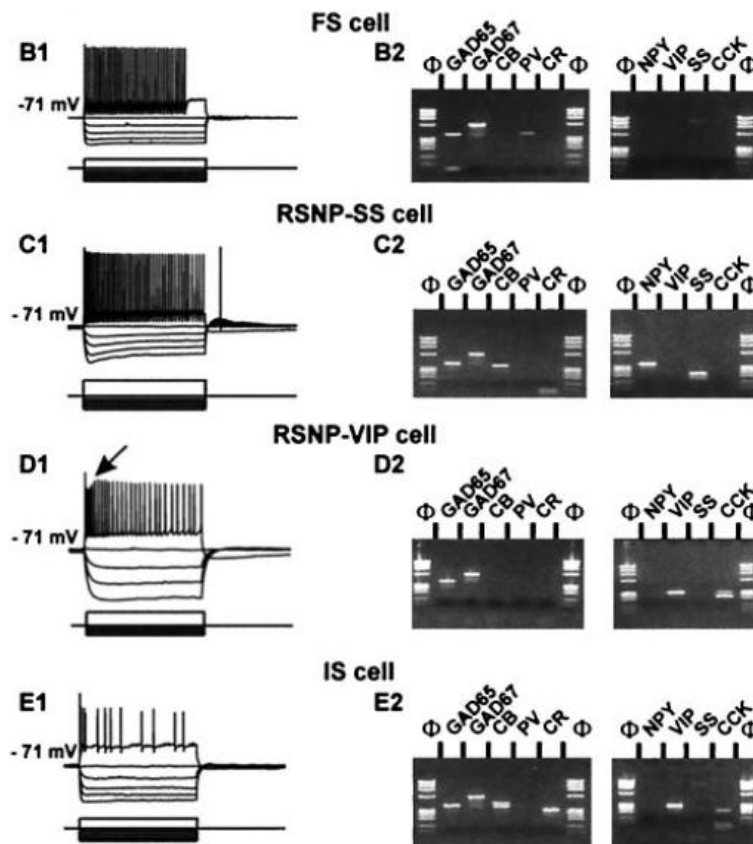


Figure 11 : Caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques de quatre types d'interneurones

Gauche : Propriétés de décharge de quatre neurones GABAergiques en réponse à des créneaux de courant hyperpolarisant ou dépolarisant. Noter les fortes fréquences de décharge des interneurones, avec (neurone C1 et D1) ou sans adaptation de fréquence (neurones B1), à l'exception du neurone E1 qui émet des décharges de PA à intervalles irréguliers. **Droite :** Gel d'agarose présentant l'expression de marqueurs moléculaires dont les **GAD 65** et **GAD 67**, enzymes de synthèse du GABA ; la calbindine : **CB**, la parvalbumine : **PV** et la calrétinine : **CR**, protéines de liaison au calcium ; le neuropeptide **Y** : **NPY**, le peptide intestinal vasoactif : **VIP**, la somatostatine : **SS** et la cholécystokinine : **CCK**, neuropeptides cérébraux. [Source : *Adapté de Cauli et al., 2000*]

2. Les cellules étoilées

Les cellules étoilées présentent plusieurs dendrites émergeant du soma qui ne permettent pas de déterminer de dendrite apicale. Elles possèdent un axone court et restreint au circuit cortical local. On les rencontre essentiellement dans la couche **IV** des aires sensorielles. Du fait de leur localisation, elles reçoivent les afférences directes du thalamus. Au niveau électrophysiologique, ces cellules sont caractérisées par un profil de décharge similaire aux neurones pyramidaux (Connors and Gutnick, 1990 ; McCormick et al., 1985).

3. Les cellules pyramidales

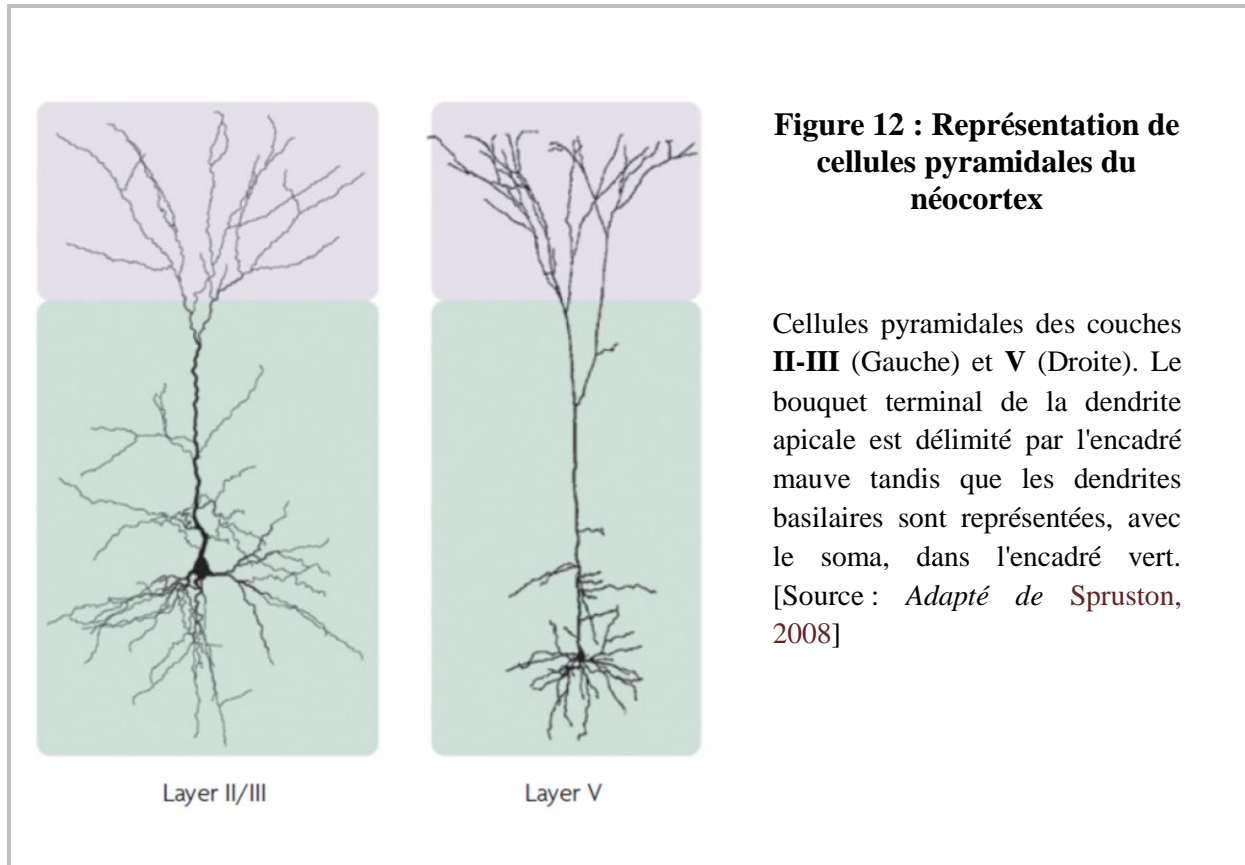
Les cellules pyramidales représentent entre 70% et 85% des neurones du néocortex (Sloper et al., 1979). Ces cellules sont dites excitatrices et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (Baughman and Gilbert, 1981).

a. Caractérisation morphologique

Les cellules pyramidales tirent leur nom de leur soma de forme conique (**Figure 12**). Une dendrite apicale émerge radialement du corps cellulaire pour s'étendre jusqu'à la couche moléculaire, s'y ramifier et former le bouquet terminal. Des dendrites basilaires émergent latéralement du soma et se ramifient plus localement (DeFelipe and Fariñas, 1992). L'arborisation dendritique est plus ou moins développée selon les couches corticales. Les dendrites sont couvertes d'épines (**Figure 13**) qui reçoivent le contact synaptique des axones des neurones présynaptiques.

L'axone des cellules pyramidales émerge à la base du corps cellulaire ou à la base d'une dendrite basilaire. Il plonge ensuite dans le cortex puis pénètre dans la substance blanche avant de rejoindre d'autres aires corticales ou sous-corticales. Pendant son trajet descendant, l'axone donne naissance à des collatérales qui peuvent être distribuées proche du corps cellulaire ou former des prolongements radiaux (en-dessous ou au-dessus de la couche à

laquelle appartient le soma dont il est issu) ou horizontaux (à distance du soma). Ainsi, les cellules pyramidales sont les neurones efférents du cortex cérébral.



Une variabilité morphologique au niveau de la taille est observée en fonction des couches corticales considérées. Relativement petites dans les couches superficielles, les cellules peuvent atteindre des tailles considérables dans les couches profondes (quelques dixièmes de millimètres). Ainsi, il existe dans la couche **V** du cortex moteur, des cellules pyramidales géantes, appelées cellules de Betz, qui projettent leur axone jusque dans la moelle épinière.

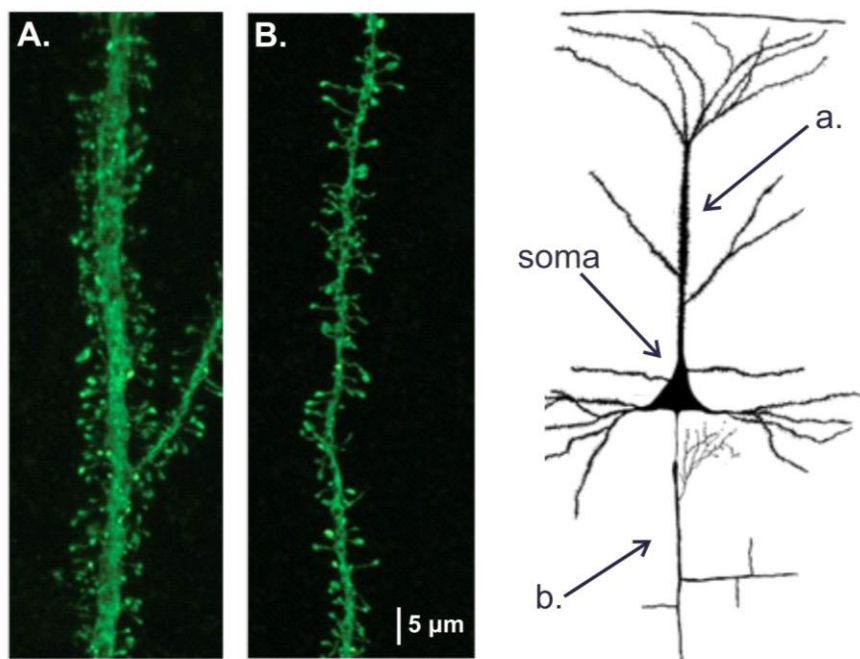


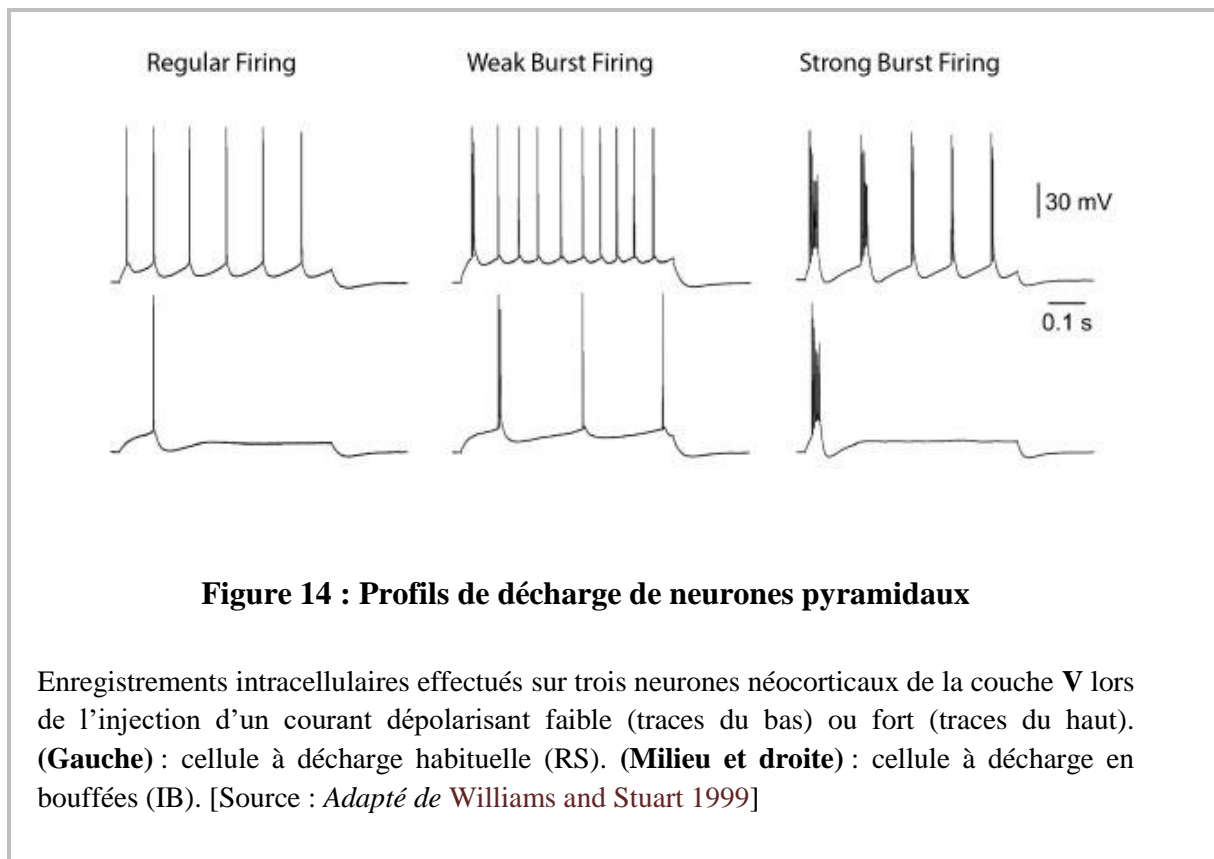
Figure 13 : Epines dendritiques de cellule pyramidale

Gauche : Images en microscopie confocale d'une portion d'une dendrite apicale (A) et basale (B) d'une cellule pyramidale de la couche **III** du cortex cingulaire obtenues par injection intracellulaire et immunocytochimie. De nombreuses épines dendritiques sont présentes le long de chaque dendrite. Droite : Représentation schématique d'une cellule pyramidale et localisation de la dendrite apicale (a) et basale (b). [Source : *Adapté de Benavides-Piccione et al., 2013*]

b. Caractérisation électrophysiologique

Les cellules pyramidales peuvent également être identifiées par leurs propriétés électrophysiologiques caractéristiques (Connors and Gutnick, 1990). Ces cellules émettent en général des PA¹⁷ de longue durée (durée mesurée à mi-hauteur, supérieure à la milliseconde, (McCormick et al., 1985)).

¹⁷ PA : Potentiel d'Action



On distingue deux profils de décharge pour ces neurones (**Figure 14**) : les décharges habituelles (RS¹⁸) et les décharges en bouffées (IB¹⁹). Le profil de décharge dite "habituelle" est le plus courant. Il est caractérisé par une réduction rapide et marquée de la fréquence instantanée des PA (adaptation de fréquence). Les cellules pyramidales à décharge en bouffées sont plus rares. Elles se situent généralement dans les couches **IV-V** du cortex cérébral. En outre, ce phénotype électrophysiologique singulier semble être particulièrement sensible aux anesthésiques (Christophe, 2005).

Les travaux que j'ai réalisés au cours de mon doctorat se sont portés sur les cellules pyramidales des couches **II-III** du cortex somatosensoriel de souris.

¹⁸ RS : *Regular Spiking*

¹⁹ IB : *Intrinsic Bursting*

Le néocortex est impliqué dans des processus cognitifs complexes tels que la reconnaissance des formes, le langage ou le contrôle volontaire du mouvement. Ses afférences sensorielles et ses connexions internes réciproques en font un centre d'intégration et de traitement de l'information majeur.

L'altération d'un ou de plusieurs des types cellulaires corticaux en étroite relation conduit généralement à des dysfonctions pathologiques. Dans la maladie d'Alzheimer (la MA) par exemple, on observe à la fois une dégénérescence des synapses puis des neurones (Nelson et al., 2012) et une réactivité astrocytaire et microgliale (Acosta et al., 2017 ; Bagyinszky et al., 2017 ; Yin et al., 2017) perturbant fortement l'homéostasie corticale et les fonctions cognitives. Durant mon travail de thèse, je me suis intéressée aux origines des dysfonctionnements corticaux dans la MA. Ce projet sera présenté dans la première partie de mon manuscrit.

Les fonctions du néocortex sont sous l'influence de systèmes neuromodulateurs extracorticaux tels que les systèmes cholinergiques, dopaminergiques et noradrénergiques. Ces derniers sont impliqués dans les processus d'éveil, d'attention et d'apprentissage. Au cours de ma thèse, je me suis également penchée sur la modulation des activités corticales par la noradrénaline. Cette étude sera traitée dans la seconde partie de ce manuscrit.

Partie 2 :

Etude du métabolisme des neurones pyramidaux corticaux dans un modèle murin de la pathologie Alzheimer

Introduction

I. Le métabolisme du glucose est essentiel aux fonctions neuronales

A. Le glucose sanguin fournit l'énergie nécessaire au maintien des activités neuronales et à l'intégrité du tissu nerveux

Avec le cœur, le foie et les reins, le cerveau est un des organes les plus énergivores du corps humain. Comme il possède peu de réserves énergétiques, il dépend d'un apport continu en nutriments. Si le flux sanguin cérébral est interrompu, les fonctions cessent en quelques secondes et quelques minutes suffisent pour causer des dommages irréversibles aux constituants cellulaires (Ames et al., 1995 ; Iadecola, 2014).

1. Le glucose est la principale source d'énergie pour le cerveau

Bien qu'il ne représente que 2% de la masse corporelle, le cerveau humain consomme à lui seul environ 20% du glucose sanguin (Kety SS, 1957 ; Bruce-Keller et al., 1999). Son niveau de métabolisme aérobie est élevé et son quotient respiratoire est proche de 1, ce qui indique que l'oxydation du glucose est la voie métabolique majeure pour la production d'énergie (Siesjö, 1978 ; Cholet et al., 2001). Toutefois, une récente étude révèle que l'utilisation oxydante du glucose varie considérablement d'une aire cérébrale à une autre (Vaishnavi et al., 2010).

La vitesse de prélèvement du glucose et sa conversion en différents métabolites ont pu être évaluées grâce à l'utilisation d'un analogue du glucose marqué au carbone 14, le ^{14}C -2DG²⁰ (Wree, 1990). Cette technique est basée sur l'observation faite que le 2DG entre dans les cellules par les mêmes transporteurs que le glucose (voir **partie I.A.3.b.**) où il est phosphorylé en 2DG6P²¹. Cependant, contrairement au glucose, l'absence de groupement hydroxyle sur son deuxième carbone le rend peu métabolisable. De plus, ce composé inhibe l'activité des enzymes responsables de la métabolisation du glucose (Ralser et al., 2008). Enfin, comme l'activité de la phosphatase catalysant la réaction de déphosphorylation du

²⁰ 2DG : 2-deoxy-D-glucose

²¹ 2DG6P : 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate

2DG6P en 2DG est faible dans le cerveau des mammifères, le 2DG6P est piégé dans les cellules pendant plusieurs heures. La vitesse d'utilisation du glucose peut ainsi être évaluée en mesurant, par autoradiographie sur tranches de tissus, la quantité de 2DG et de 2DG6P accumulée dans les différents compartiments.

Les travaux précurseurs de Sokoloff et al., à ce sujet ont permis de montrer qu'un approvisionnement continu en glucose et en oxygène est primordial au maintien de l'activité neuronale (Gjedde et al., 1980 ; Sokoloff et al., 1977). Plus récemment, le développement des techniques d'imagerie non invasives a permis d'évaluer le taux de métabolisation du glucose au niveau du cerveau humain. Au repos, le cortex consomme en moyenne 0.40 μmol de glucose/g/min (Chhina et al., 2001 ; Fox et al., 1988 ; Shen et al., 1999) soit approximativement 3.4×10^{21} molécules d'ATP par minute (Lennie, 2003).

Il est important de noter que dans certaines circonstances, en période de jeûne prolongé par exemple, les corps cétoniques peuvent être utilisés comme substrats additionnels par le cerveau. Ces derniers sont essentiellement produits par le foie via un processus de dégradation des lipides appelé cétogénèse.

Durant le développement, le cerveau est également capable d'utiliser divers substrats en complément du glucose, principalement les corps cétoniques et le lactate (Cremer and Heath, 1974 ; Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993 ; Schroeder et al., 1991).

2. En quoi l'activité cérébrale est-elle énergivore ?

Comprendre comment la demande énergétique se répartit entre les types cellulaires, au sein des différentes aires et selon l'activité cérébrale, est un domaine actif de la recherche (Fox and Raichle, 2007). Ce domaine a été stimulé en large partie grâce à l'amélioration des techniques d'imagerie non invasives comme la TEP et l'IRMf (**voir II. de cette partie**). Ces techniques associées à d'autres approches *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence que plus de 60% de l'énergie apportée par le glucose sanguin sont dédiés aux activités de communication (Attwell and Laughlin, 2001 ; Lennie, 2003 ; Sibson et al., 1998).

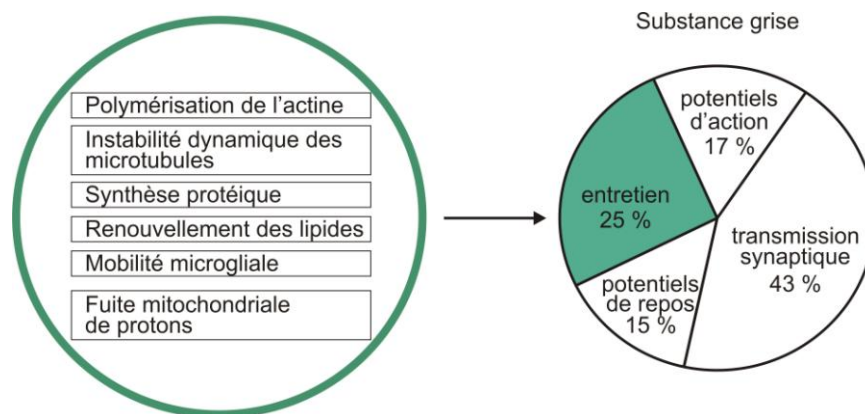


Figure 15 : Budget énergétique dans la substance grise

Contribution relative des différentes tâches effectuées au sein du néocortex. Les activités liées à la communication occupent 80% de la demande énergétique. Le terme d'entretien regroupe de nombreux processus résumés dans le cercle de gauche. [Source : *Adapté de Engl and Attwell, 2015*]

Plus précisément, des études par RMN²² réalisées chez le rat ont montré que la vitesse d'oxydation du glucose est égale à la rapidité avec laquelle le glutamate est converti en glutamine dans le cerveau. Ceci suggère que la majorité de la production énergétique est dévolue à la transmission neuronale glutamatergique (**Figure 15**) (Sibson et al., 1998). Or, cette transmission génère un grand nombre de mécanismes (courants postsynaptiques, PA, recyclage des neurotransmetteurs) dont les demandes énergétiques varient suivant les espèces (Attwell and Laughlin, 2001).

²² RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

a. Rétablir les gradients ioniques

Au niveau présynaptique, les PA sont sous-tendus par un rapide courant entrant sodique et un courant sortant potassique tandis qu'au niveau postsynaptique l'activation des récepteurs AMPA²³ et NMDA²⁴ par le glutamate génère des flux d'ions (principalement sodiques et calciques) (Attwell and Laughlin, 2001) et l'activation des récepteurs couplés aux protéines G conduit à une libération de calcium intracellulaire (**Figure 17**). Ces phénomènes perturbent l'équilibre ionique du neurone.

L'importance des flux ioniques dans la forte demande énergétique du cerveau a été mise en évidence à la fin des années 80. En travaillant sur des tranches de cerveau de lapin, Whittam mesure une chute d'environ 50% de la consommation en oxygène après inhibition de la pompe sodium-potassium par l'ouabaine (Whittam, 1962). En 1989, Shibuki fait des observations similaires chez le rat en utilisant une électrode à oxygène de type électrode de Clark (Shibuki, 1989). Des travaux conduits chez le chien anesthésié quantifient plus précisément l'énergie requise par la pompe sodium-potassium : l'extrusion du sodium cellulaire serait responsable à 55% de l'utilisation de l'oxygène du cerveau (Astrup et al., 1981).

La restauration des gradients ioniques est principalement assurée par la pompe Na⁺/K⁺ ATPase (Ames, 2000). Découverte par Skou en 1957 (Skou, 1957), cette pompe régule l'entrée de K⁺ en même temps que la sortie de Na⁺ des cellules et participe activement au maintien du gradient électrochimique de la membrane (**Figure 16**) (Ames and Lecar, 1992 ; “Brain energy metabolism by B. K. Siesjo, John Wiley & Sons, New York, 1978,” 1979 ; Erecińska and Silver, 1989 ; Locasale and Cantley, 2011 ; Scheiner-Bobis, 2002; Sokoloff et al., 1996). Dans le cerveau, son activité est particulièrement localisée au niveau des terminaisons nerveuses (de Lores Arnaiz and Ordieres, 2014).

Une seconde pompe joue un rôle central dans l'homéostasie ionique en assurant le maintien de la concentration en calcium intracellulaire libre entre 100 et 200 nM²⁵ (Di Leva et al., 2008). Il s'agit de la pompe PMCA²⁶ (Pedersen and Carafoli, 1987). Découverte à la suite de

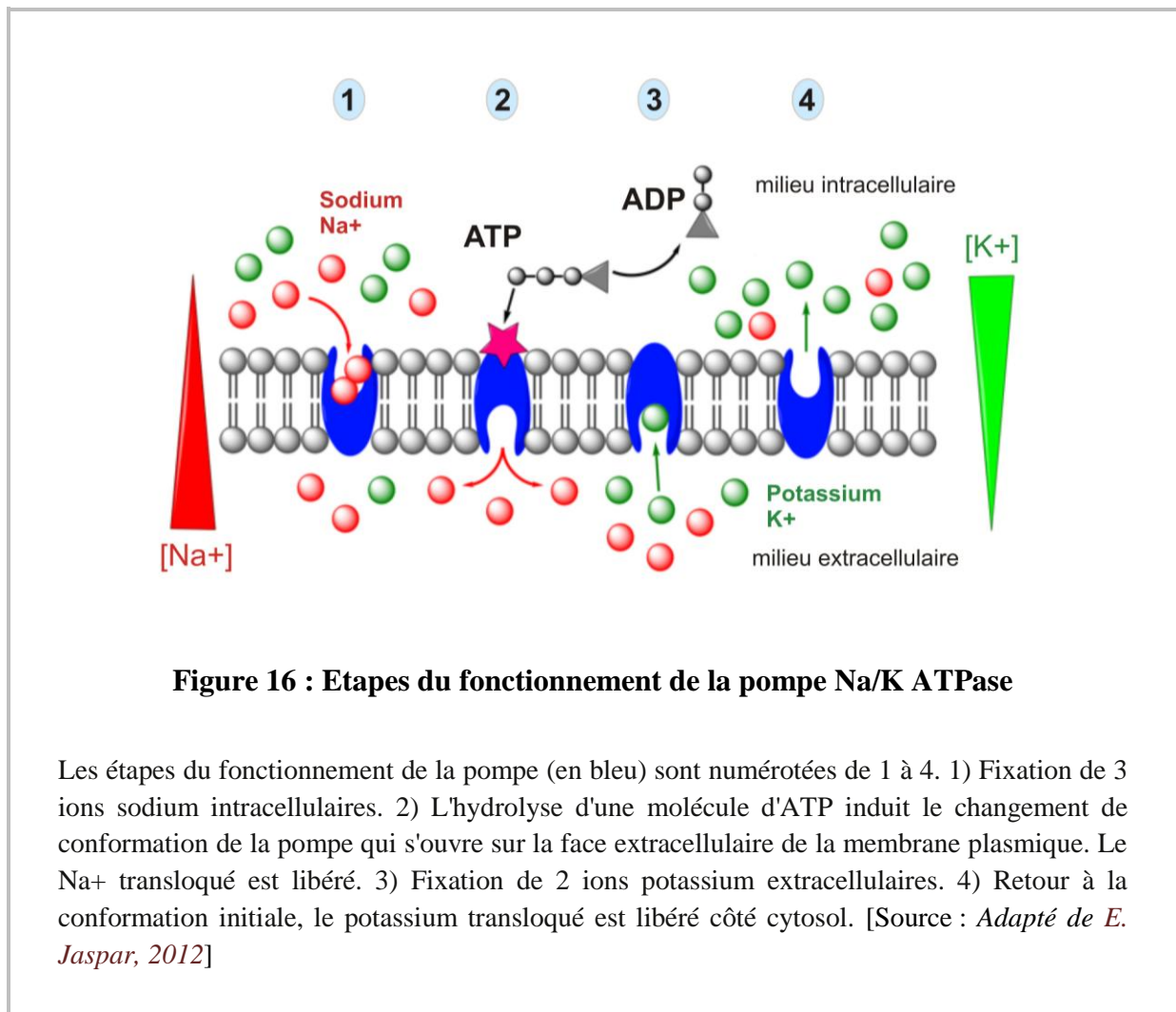
²³ AMPA : *α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4isoxazolePropionic Acid*

²⁴ NMDA : N-Methyl-D-Aspartate

²⁵ nM : nanoMolaire

²⁶ PMCA : *Plasma Membrane Calcium ATPase*

la mise en évidence d'un système spécialisé dans l'extrusion du calcium contre son gradient de concentration (Brini and Carafoli, 2011 ; Strehler, 2013), cette pompe couple l'hydrolyse d'une molécule d'ATP au transport d'une molécule de calcium du cytosol vers l'espace extracellulaire (Strehler, 2013). A défaut d'être chassé activement de la cellule, le calcium peut être stocké dans les citernes intracellulaires formées par le réticulum endoplasmique. Ce processus est également demandeur d'énergie et fait intervenir les pompes SERCA²⁷ (Baba-Aissa et al., 1996).



Enfin, le rééquilibrage des flux d'ions a lieu également en dehors des périodes de décharge de PA, afin de limiter les fluctuations du potentiel de membrane (Attwell and

²⁷ SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase

Iadecola, 2002 ; Shulman et al., 2004). On estime à environ 15% la consommation énergétique liée au maintien du potentiel de repos des neurones (**Figure 15**) (Attwell and Laughlin, 2001; Harris and Attwell, 2012; Lennie, 2003)

b. Synthétiser et recycler les neurotransmetteurs

Au niveau présynaptique, le remplissage des vésicules d'exocytose en neurotransmetteurs requiert de l'énergie (**Figures 15 et 17**). En effet, l'entrée du glutamate dans les vésicules est assurée par une pompe à protons ATP-dépendante (Attwell and Laughlin, 2001).

La libération vésiculaire des neurotransmetteurs fait suite à un influx calcique généré par un PA. L'évacuation du calcium cytosolique fait de nouveau intervenir les pompes PMCA et SERCA dépendantes de l'ATP (**Figure 17**). Et bien que l'ensemble des mécanismes impliqués soit encore mal compris (Attwell et Laughlin), on estime qu'environ 400 molécules d'ATP sont nécessaires pour assurer l'exocytose et le recyclage d'une seule vésicule présynaptique (Attwell and Laughlin, 2001 ; Harris et al., 2012 ; Marsh and McMahon, 1999).

Le glutamate libéré dans la fente synaptique est rapidement capté par les astrocytes (**Figure 17**) grâce à un système de cotransport dans lequel une molécule de glutamate, 3Na^+ et 1H^+ entre dans la cellule en échange de la sortie d' 1K^+ (Levy et al., 1998). Au total, environ 1.33 molécule d'ATP est consommée par molécule de glutamate récupérée par la cellule.

Au sein des astrocytes, environ un tiers du glutamate est converti en glutamine (de Barry et al., 1983). Cette réaction nécessite 1 ATP par molécule de glutamate. La glutamine peut être libérée par la glie et entrer dans les neurones via un système de transport facilité, dépendant du gradient de concentration en glutamine (Chaudhry et al., 1999 ; Tamarappoo et al., 1997). Au total, environ 2,67 molécules d'ATP sont nécessaires au recyclage d'une molécule de glutamate (Attwell and Laughlin, 2001).

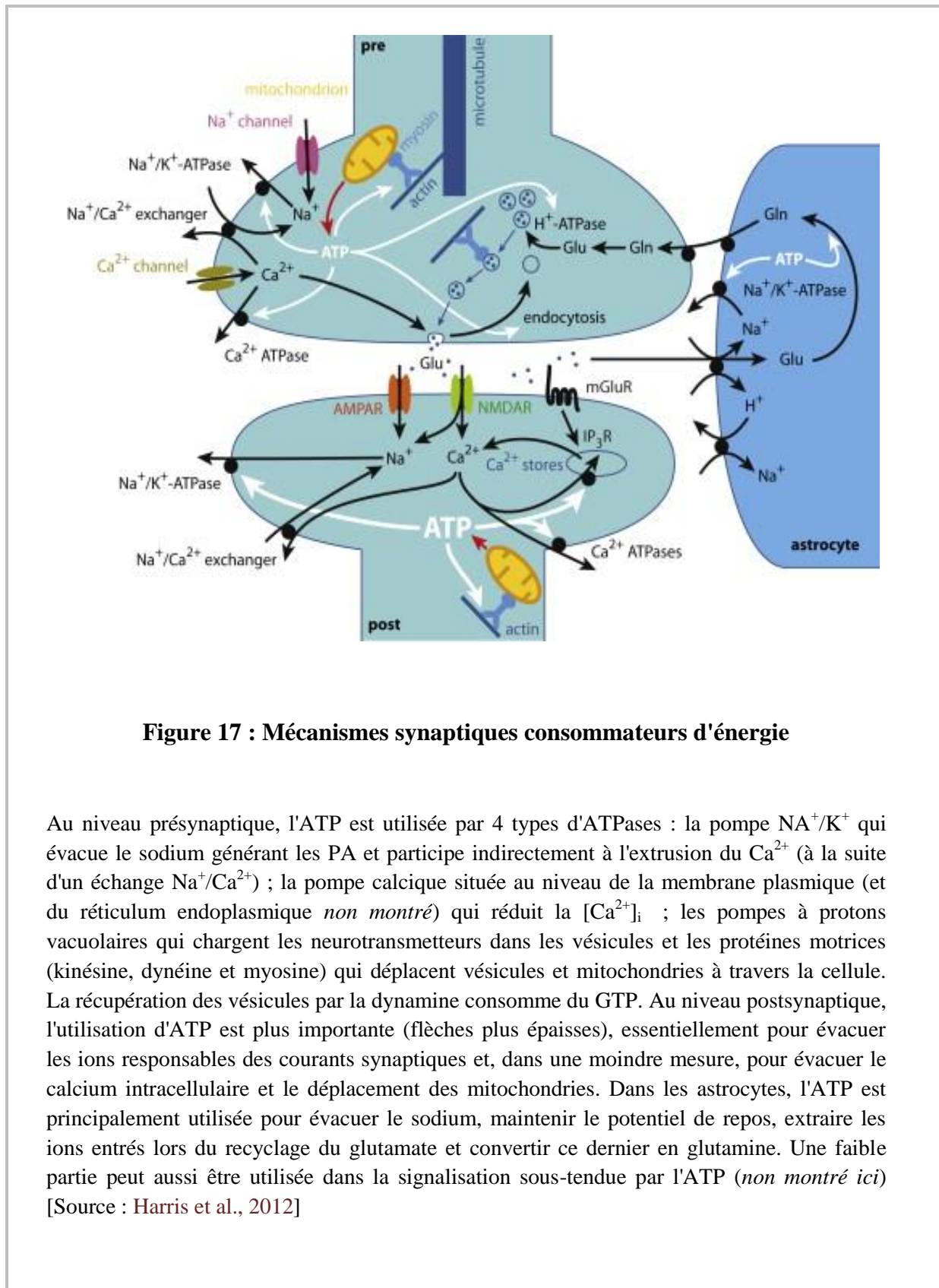


Figure 17 : Mécanismes synaptiques consommateurs d'énergie

Au niveau présynaptique, l'ATP est utilisée par 4 types d'ATPases : la pompe Na^+/K^+ qui évacue le sodium générant les PA et participe indirectement à l'extrusion du Ca^{2+} (à la suite d'un échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) ; la pompe calcique située au niveau de la membrane plasmique (et du réticulum endoplasmique *non montré*) qui réduit la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; les pompes à protons vacuolaires qui chargent les neurotransmetteurs dans les vésicules et les protéines motrices (kinésine, dynéine et myosine) qui déplacent vésicules et mitochondries à travers la cellule. La récupération des vésicules par la dynamine consomme du GTP. Au niveau postsynaptique, l'utilisation d'ATP est plus importante (flèches plus épaisses), essentiellement pour évacuer les ions responsables des courants synaptiques et, dans une moindre mesure, pour évacuer le calcium intracellulaire et le déplacement des mitochondries. Dans les astrocytes, l'ATP est principalement utilisée pour évacuer le sodium, maintenir le potentiel de repos, extraire les ions entrés lors du recyclage du glutamate et convertir ce dernier en glutamine. Une faible partie peut aussi être utilisée dans la signalisation sous-tendue par l'ATP (*non montré ici*) [Source : Harris et al., 2012]

c. Maintenir l'intégrité du tissu cérébral

Si la majeure partie de l'énergie produite par l'oxydation du glucose est dévolue aux activités de communication, celle-ci ne peut avoir lieu sans le maintien de l'intégrité du tissu cérébral (Buzsáki et al., 2007 ; Iadecola, 2004). Selon Gibb et al., environ 25% du budget énergétique serait dévolu aux tâches autres que la communication (**Figure 15**) (Attwell and Gibb, 2005). Effectivement, de nombreux mécanismes essentiels, comme la synthèse des protéines et des lipides composant la cellule, nécessitent de l'énergie. La fuite de protons à travers la membrane mitochondriale doit être compensée par un système de pompage ATP-dépendant. Le déplacement des vésicules et des organites le long des microtubules nécessite des réarrangements du cytosquelette (dépolymérisation et repolymérisation de l'actine globulaire) et fait intervenir des moteurs moléculaires qui consomment de l'ATP (**Figure 17**). (Voir Engl and Attwell, 2015 pour revue).

La communication neuronale est donc particulièrement énergivore. La majeure partie de l'énergie nécessaire est produite à partir du glucose sanguin.

3. Le passage du glucose sanguin vers les cellules se fait grâce à des transporteurs spécifiques

Dans les conditions physiologiques normales, le transport du glucose à travers la BHE²⁸ est le facteur limitant pour le métabolisme cérébral (Maher et al., 1994).

L'inhibition pharmacologique des fonctions de transport par des substances telles que la phloretine entraîne, *in vitro*, un transfert de glucose à travers la BHE inférieur à 5% par rapport à la condition contrôle. Il y a donc très peu de diffusion simple dans le cerveau ; les transporteurs du glucose assurent plus de 95% du transport du glucose.

²⁸ BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

Les jonctions serrées entre les cellules endothéliales de la BHE nécessitent un transport transcellulaire du glucose sanguin. Pour gagner le cerveau, le glucose devra traverser les membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales.

a. Familles de transporteurs du glucose

Il existe deux grandes familles de transporteurs du glucose : les transporteurs dépendants du sodium et les transporteurs passifs, appelés GluT²⁹. Les premiers utilisent le gradient électrochimique du sodium de part et d'autre de la membrane plasmique pour transporter le glucose contre son gradient de concentration. On retrouve ces transporteurs au niveau des reins ou de la muqueuse intestinale mais leur présence dans le cerveau n'a pas encore été démontrée (Uldry and Thorens, 2004). Les seconds transportent le glucose selon son gradient de concentration par un mécanisme de transport facilité (Uldry and Thorens, 2004).

Chez l'humain, la famille des GluT regroupe 14 protéines (GluT1-14) qui diffèrent par leurs nombreux substrats et leur cinétique de transport (Thorens and Mueckler, 2010). Ces protéines possèdent 12 domaines transmembranaires formant un canal hydrophile au centre duquel se trouve un pore hydrophobe (**Figure 18**) (Mueckler et al., 1985). Elles ont été hautement conservées au cours de l'évolution ; ainsi pour GluT1 par exemple, la séquence d'acides aminés est homologue à plus de 95% entre les différents mammifères (Carruthers et al., 2009).

b. Isoformes cérébrales des transporteurs du glucose

Dans le cerveau, le glucose entre dans les cellules par un transport facilité via les GluT. De nombreuses études menées sur les rongeurs concluent que ce transport est principalement sous-tendu par GluT1 et GluT3 (Leino et al., 1997 ; McEwen and Reagan, 2004 ; Simpson et al., 2007).

²⁹ GluT : *Glucose Transporters*

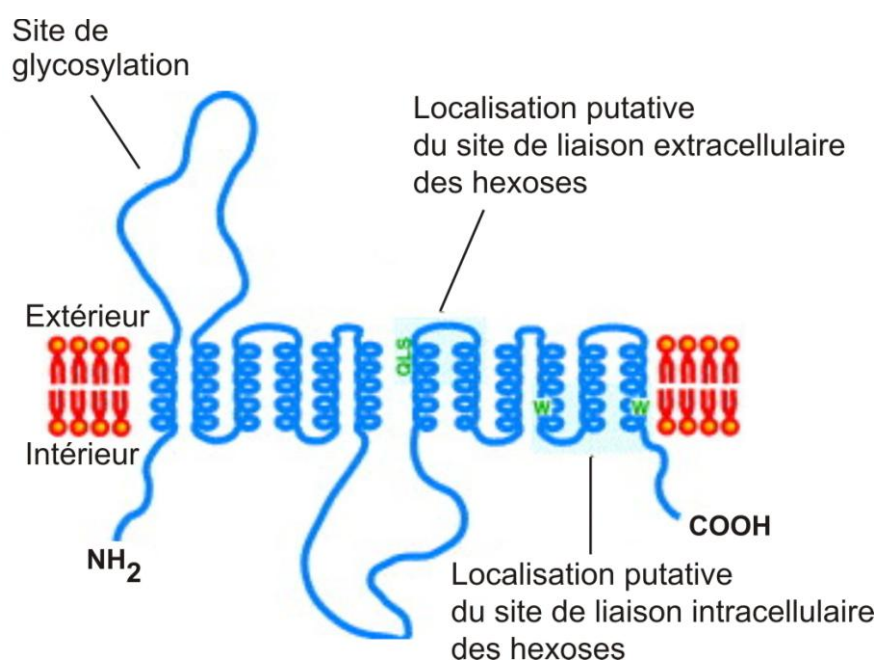


Figure 18 : Structure secondaire des transporteurs du glucose de la superfamille des GluTs

12 hélices α forment la partie transmembranaire du transporteur. Les extrémités COOH et NH₂ sont localisées sur la face interne de la cellule. La première boucle extracellulaire peut être glycosylée au niveau d'un site spécifique. Les lipides de la membrane plasmique sont représentés en rouge. [Source : *Adapté de Walmsley et al., 1998*]

GluT1

GluT1, encodé par le gène SLC2A1, a été le premier transporteur de la famille des GluT à avoir été isolé et cloné. En plus du glucose, ce transporteur peut assurer le passage du galactose et de l'acide ascorbique (Manolescu et al., 2007).

Dans le cerveau, il existe sous deux isoformes. Une isoforme de 55 kDa³⁰ est rencontrée au niveau des cellules endothéliales (Gerhart et al., 1989) tandis qu'une isoforme de 45 kDa est exprimée au niveau des pieds astrocytaires entourant le lit vasculaire (**Figures 19 et 20**)

³⁰ kDa : kiloDalton

(McCall et al., 1996 ; Pellerin et al., 2002). Cette différence de poids moléculaire est due à la présence d'un site de glycosylation au niveau de la première boucle extracellulaire de GluT1 (**Figure 18**) mais sa signification fonctionnelle reste encore à découvrir (Mueckler et al., 1985).

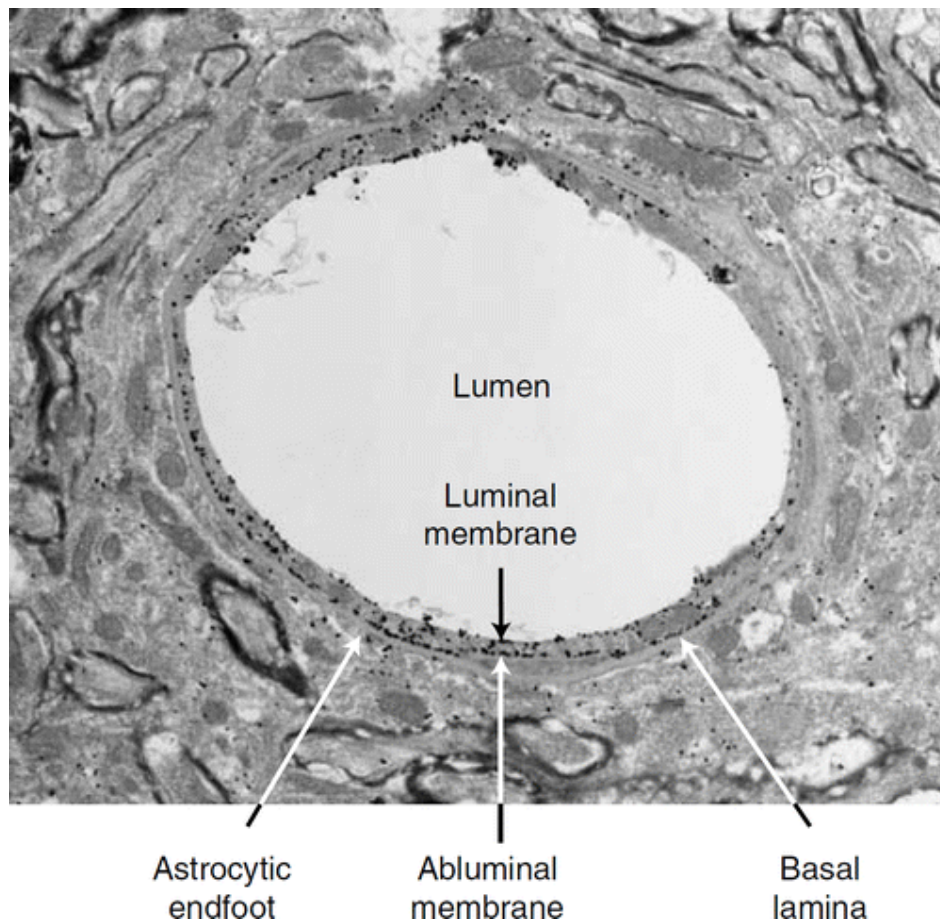


Figure 19 : Distribution périvasculaire de GluT1

Micrographie électronique de GluT1 immunomarcqué à l'or colloïdal. Le transporteur est distribué au niveau des pieds astrocytaires et des cellules endothéliales cérébrales. Sa distribution est asymétrique au niveau des cellules endothéliales. La plus grande fraction de GluT1 est localisée à la membrane abluminale. La densité de transporteurs est plus faible au niveau de la membrane luminale, là où la concentration en glucose est la plus forte. [Source : Simpson et al., 2007]

La microscopie électronique a permis de faire ressortir une répartition asymétrique de GluT1 au niveau des cellules endothéliales. Les dosages protéiques effectués par Simpson et al., ont confirmé que la densité en transporteurs est plus faible côté cytoplasmique et luminal et plus haute côté membrane abluminale (Simpson et al., 2001). Cette asymétrie assure la polarité du transport du glucose à travers la BHE. En parallèle, la concentration en glucose dans le tissu cérébral étant 2 à 5 fois moins élevée que dans le plasma sanguin, le fort gradient de concentration entre sang et cerveau facilite le transport du glucose à travers les membranes des cellules endothéliales (Mergenthaler et al., 2013 ; Silver and Erecińska, 1994).

Enfin, s'il est abondant dans les cellules gliales et endothéliales, GluT1 a également été détecté dans les neurones en culture et *in vivo* en condition de stress hypoxique (Gerhart et al., 1994 ; Lee and Bondy, 1993 ; Maher et al., 1991 ; Vannucci et al., 1998c ; Werner et al., 1989) bien que ce ne soit pas le transporteur le plus exprimé dans ces cellules.

GluT3

Dans les neurones, GluT3 est le transporteur majoritaire (**Figure 20**) (Maher and Simpson, 1994). Le transporteur GluT3 humain a été cloné pour la première fois à partir de lignée cellulaire dérivée de muscle squelettique fœtal en utilisant une sonde d'ADN complémentaire de GluT1, avec lequel il partage 64.4 % d'identité (Kayano et al., 1988).

GluT3 a reçu son titre de "transporteur neuronal" lorsque la forme murine a été clonée car il s'est avéré que chez les souris, l'ARNm de GluT3 était essentiellement détecté au niveau du cerveau et plus précisément au niveau des neurones (Gould and Bell, 1990). Les travaux d'hybridation *in situ* réalisés dans les années 90 par Nagamatsu et son équipe ont révélé une localisation de GluT3 bien moins restreinte chez l'humain (Nagamatsu et al., 1992).

Au niveau du cerveau, l'affirmation selon laquelle GluT3 serait situé de façon prédominante au niveau des prolongements cellulaires (i.e. axones et dendrites) et peu au niveau du soma est discutable. De nombreuses techniques de marquage (immunocytochimie, hybridation *in situ*) de neurones de rongeurs ou humains ont également détecté GluT3 au niveau des corps cellulaires des neurones (Gerhart et al., 1995 ; Maher et al., 1991, 1991 ; Mantych et al., 1992 ; Vannucci et al., 1997).

Des études *in vivo* menées par Bondy et al., chez le rat, montrent que l'expression de GluT3 est très faible dans le cerveau prénatal où GluT1 est l'isoforme prédominante (Bondy et al., 1992). L'expression de GluT1 et de GluT3 augmente avec la maturation cérébrale, parallèlement à l'augmentation de l'utilisation du glucose par le cerveau. Pour GluT3 cependant, cette augmentation est régionalisée et dépendante de l'activité neuronale (Simpson et al., 2008) ; elle coïnciderait avec la maturation de la connectivité synaptique (Vannucci et al., 1998a).

La capacité de transport du glucose par les neurones excède de loin celle des astrocytes. En effet, GluT3 présente une importante capacité de transport ainsi qu'une très haute affinité pour le D-glucose ($K_m \sim 2$ mM pour GluT3 contre ~ 25 mM pour GluT1) (Nishimura et al., 1993). Ceci assure un approvisionnement constant des neurones, même quand les concentrations interstitielles en glucose sont basses (Maher et al., 1996 ; Simpson et al., 2008).

Autres isoformes détectées dans le cerveau

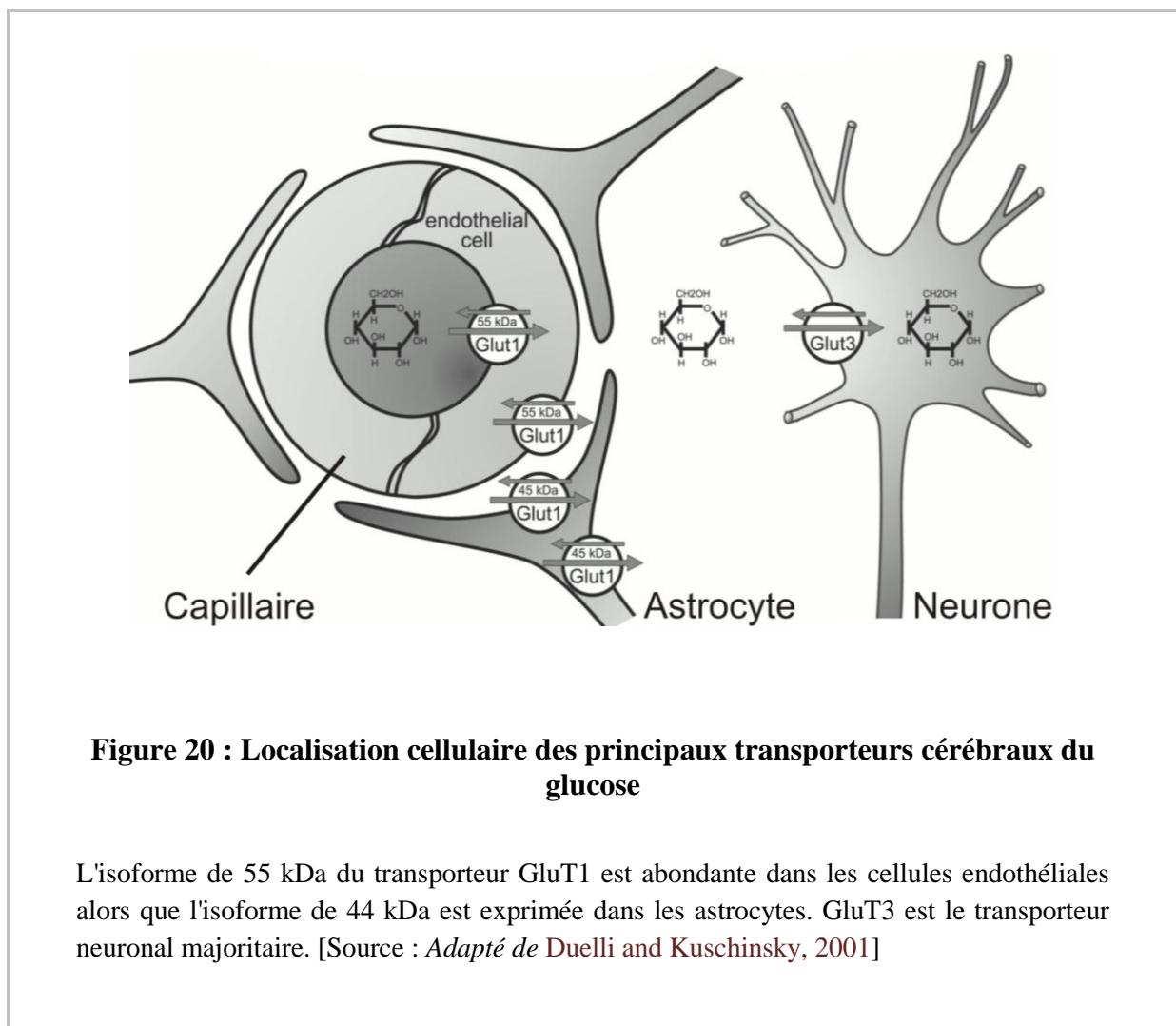
D'autres isoformes ont pu être détectées dans le cerveau. Chacune présente des cinétiques et des spécificités de substrats propres en lien avec ses fonctions physiologiques.

GluT4 est exprimé dans de nombreux sous-types neuronaux incluant les cellules de Purkinje et les cellules en grain du cervelet, les cellules principales et les interneurons de l'hippocampe ou encore des cellules isolées du cortex et de l'hypothalamus (Apelt et al., 1999 ; Bady et al., 2006 ; Kobayashi et al., 1996 ; Leloup et al., 1996 ; Rayner et al., 1994 ; Vannucci et al., 1998b, p. 4). Contrairement aux isoformes GluT1 et GluT3, GluT4 est sensible à l'insuline. Dans une étude conduite chez le rat, Grillo et ses collègues ont montré que l'injection intracérébroventriculaire d'insuline provoquait une translocation de GluT4 à la membrane plasmique et ce, dans un intervalle de temps similaire à l'augmentation du prélèvement de glucose observé pendant la réalisation de tâches hippocampes-dépendantes (Grillo et al., 2009). De récentes études ont depuis confirmé le rôle prépondérant de GluT4

dans l'approvisionnement énergétique des synapses actives (Pearson-Leary and McNay, 2016).

Les isoformes GluT6 et 8 ont été identifiées dans les neurones, bien que leur structure primaire particulière (i.e. la présence d'un motif dileucine au niveau de leur extrémité C terminale) favorise un confinement au niveau des membranes intracellulaires (McEwen and Reagan, 2004). Tout comme GluT4, ils sont sensibles à l'insuline.

La présence de GluT2 a quant à elle été rapportée dans les neurones de l'hypothalamus (Arluison et al., 2004).



Enfin, une expression exclusive de GLUT5, capable de transporter à la fois le glucose et le fructose, a été mise en évidence dans les cellules microgliales (Horikoshi et al., 2003 ; Payne et al., 1997).

Une fois extrait des capillaires et acheminé dans les cellules par les transporteurs, le glucose est dégradé par un ensemble de réactions exergoniques assurant la production d'énergie.

B. Le métabolisme du glucose fait intervenir différents compartiments cellulaires

La technique de spectroscopie RMN du carbone 13 a permis d'évaluer les différentes étapes de la métabolisation du glucose dans le cerveau (Gruetter et al., 1998 ; Henry et al., 2002, 2010 ; Hyder et al., 1997 ; Mason et al., 1995). Dans cette méthode, du glucose enrichi au carbone 13, généralement marqué en position C1 ou C6, est injecté par voie veineuse. L'incorporation dynamique du carbone 13 dans les métabolites cérébraux est suivie par spectroscopie RMN (*cf* **II.B.** de cette introduction). Le processus d'oxydation débute par la glycolyse et se termine par la phosphorylation oxydante ; il fait intervenir différents compartiments cellulaires.

1. Oxydations partielles cytosoliques

a. Rétention du glucose dans la cellule

Le glucose qui pénètre dans la cellule est rapidement phosphorylé en G6P³¹. La fixation d'un groupement phosphore chargé négativement sur le glucose contribue à le confiner dans le cytosol et évite qu'il ne ressorte en cas de baisse de la concentration du glucose extracellulaire. Dans le cerveau, cette réaction est catalysée par une HK³² et consomme une molécule d'ATP (da-Silva et al., 2004).

³¹ G6P : Glucose-6-Phosphate

³² HK : HexoKinase

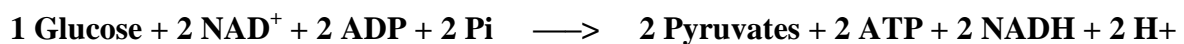
Lorsque le glucose est issu de la lyse du glycogène, il est déjà phosphorylé sous forme de G1P³³. Une phosphoglucomutase catalyse la conversion en G6P (Beamer, 2015).

b. Glycolyse

En 1897, les chimistes Edouard et Hans Buchner découvrent que des extraits de levure, exempts de cellules, sont capables de faire fermenter le sucre. En 1905, grâce aux travaux de leurs prédécesseurs, Arthur Harden et William Young observent que la fermentation du glucose dans les extraits de bactérie ne peut avoir lieu qu'en présence de phosphate inorganique et de coferment NAD³⁴ (Harden and Young, 1906). Ces découvertes ont initié la compréhension des réactions de la glycolyse. Il a fallu attendre les années 1940 pour que l'ensemble des réactions conduisant à l'oxydation du glucose en pyruvate soit mis à jour (Macfarlane and Weil-Malherbe, 1941).

Oxydation du glucose en pyruvate

Dix étapes conduisent à l'oxydation du glucose en pyruvate (**Figure 21**). Cet ensemble de réactions exergoniques est couplé à la phosphorylation endergonique d'ADP³⁵ en ATP et à la réduction de la coenzyme NAD⁺ en NADH, H⁺. Chaque réaction est catalysée par une enzyme spécifique (**Figures 21 et 22**). La glycolyse va conduire à la formation de 2 molécules de pyruvate, 2 molécules de NADH, H⁺ et 2 molécules d'ATP (4 générées - 2 consommées) par molécule de glucose. Le bilan de la réaction peut se résumer par la formule suivante :



La chaîne de réactions n'a pas constamment lieu à la même vitesse. Des points de contrôle, assurés par des enzymes allostériques, permettent d'adapter le flux glycolytique aux besoins énergétiques cellulaires.

³³ G1P : Glucose-1-Phosphate

³⁴ NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

³⁵ ADP : Adénosine DiPhosphate

Régulation de l'activité glycolytique

L'activité glycolytique peut être régulée à plusieurs niveaux. Le premier point de contrôle s'exerce au niveau de l'HK. En effet, la vitesse de phosphorylation du glucose par l'HK constitue le facteur limitant de la glycolyse (Mulukutla et al., 2010). La PFK³⁶ et la PK³⁷ constituent les deux autres points de régulation. Ces enzymes multimériques sont dites allostériques car la fixation d'un ligand en dehors du site catalytique va entraîner leur changement de conformation, favorisant ou limitant la réaction qu'elles catalysent.

Certains intermédiaires métaboliques de la glycolyse comme le F1,6BP³⁸, le F2,6BP³⁹ et le PEP⁴⁰ exercent une régulation allostérique sur ces trois enzymes (Manes and El-Maghrabi, 2005 ; Mulukutla et al., 2014). De même un excès d'ATP ou d'ACoA⁴¹, qui traduit un bilan énergétique positif, peut inhiber la PK. L'ATP, l'AMP⁴², le citrate ou encore le lactate (Costa Leite et al., 2007) sont aussi capables de se fixer sur des sites modulateurs de la PFK pour réguler son activité. Les PFK et PK cérébrales existent sous de multiples isoformes (PFKL/M/P et PKM1/M2/L/R respectivement) (Kessler and Eschrich, 2001 ; Zeitschel et al., 1996) et sont sujettes à des régulations allostériques variables. L'activité glycolytique d'une cellule pourra donc être modulée spécifiquement selon l'isoforme qui y est exprimée (Okar et al., 2001 ; Wilson, 2003 ; Yamada and Noguchi, 1999).

Faible activité glycolytique des neurones

Dans les neurones, le taux de glycolyse a été évalué à la fois par la vitesse de formation de [3H]H₂O à partir du [3H]glucose, la vitesse de formation du [14C]lactate à partir du [14C]glucose (Herrero-Mendez et al., 2009) et l'accumulation du lactate intra et extracellulaire (Bolaños et al., 1995 ; Delgado-Esteban et al., 2000). Les études concluent que l'activité glycolytique y est négligeable.

³⁶ PFK : PhosphoFructoKinase

³⁷ PK : Pyruvate Kinase

³⁸ F1,6BP : Fructose 1,6-BisPhosphate

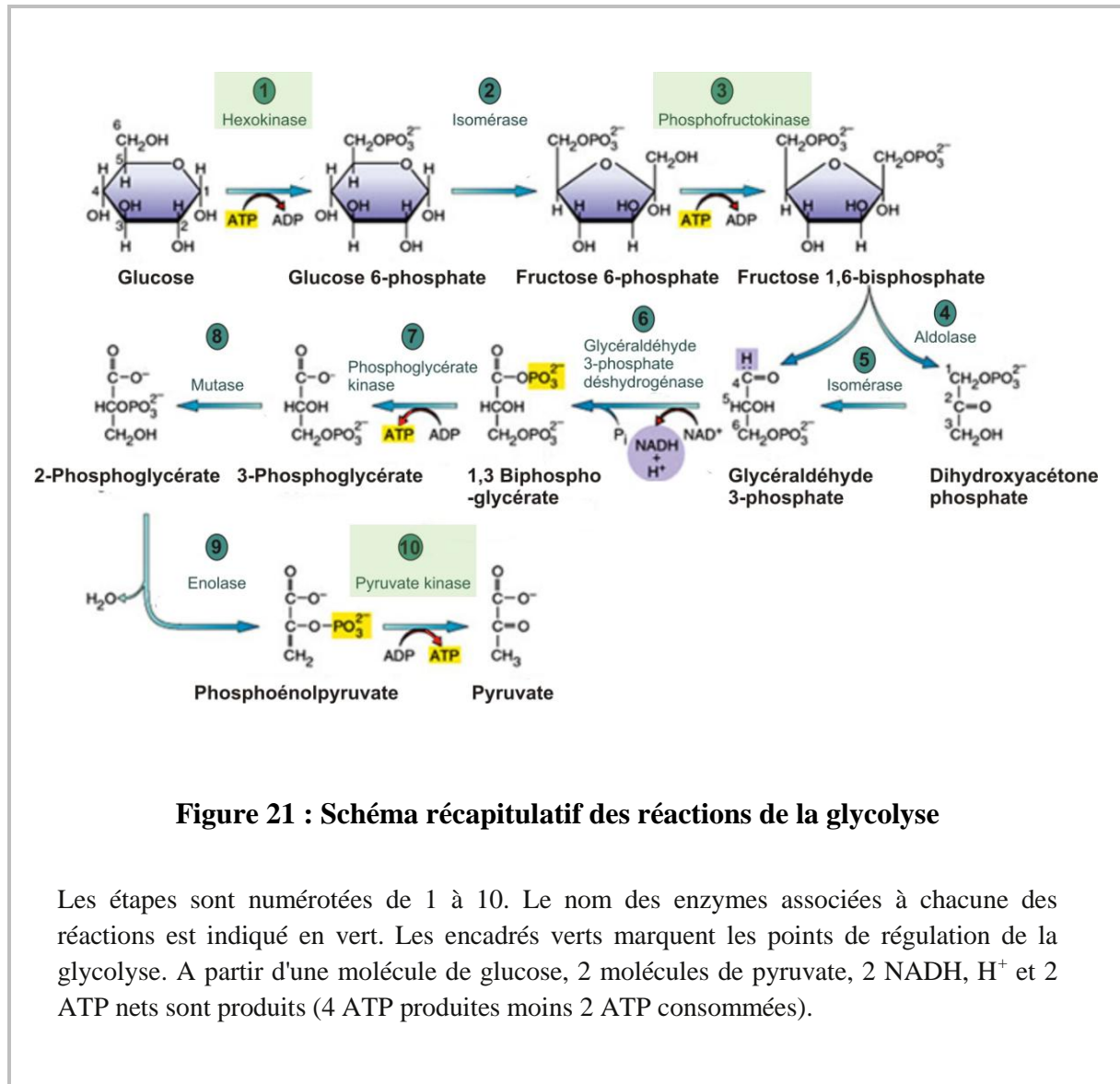
³⁹ F2,6BP : Fructose 2,6-BisPhosphate

⁴⁰ PEP : PhosphoEnolPyruvate

⁴¹ ACoA : Acétyl-Coenzyme-A

⁴² AMP : Adénosine MonoPhosphate

Dans les neurones corticaux, l'activation des récepteurs du glutamate génère une demande énergétique et une diminution d'ATP (Almeida and Bolaños, 2001 ; Gleichmann et al., 2009) mais ne provoque ni activation de la glycolyse (Delgado-Esteban et al., 2000; Kasischke et al., 2004) ni entrée de glucose (Porras et al., 2004) concomitante.



Le fait que les neurones soient incapables de stimuler la glycolyse en période de demande énergétique peut s'expliquer par la faible activité de la PFK1 (moitié moins importante dans les neurones que dans les astrocytes) (Bolaños and Almeida, 2010). Ceci est dû à la faible disponibilité en F2,6BP, effecteur positif puissant de la PFK1 (Almeida et al.,

2004). Effectivement, l'enzyme catalysant la production du F2,6BP est constamment dégradée dans les neurones (Herrero-Mendez et al., 2009), ce qui limite fortement le flux glycolytique.

La glycolyse produit du méthylglyoxal

Le MG⁴³ est un sous-produit hautement réactif principalement formé lors de la glycolyse, via la fragmentation du G3P⁴⁴ et du DHAP⁴⁵ (Allaman et al., 2015 ; Richard, 1993). Ce composé dicarboxylique est un précurseur des produits finaux de glycation avancée (AGEs⁴⁶) qui sont associés à de nombreuses pathologies telles que le diabète ou les maladies neurodégénératives (Goldin et al., 2006 ; Münch et al., 2012 ; Ramasamy et al., 2005 ; Wautier and Guillausseau, 2001).

La glycation résulte de la liaison covalente entre un sucre avec une protéine ou un lipide. Ainsi le MG réagit directement avec les lipides, les acides nucléiques et les résidus lysine et arginine des protéines pour former des AGE (Fleming et al., 2008) qui compromettent le bon fonctionnement des biomolécules.

En situation normale, différents mécanismes protègent les cellules contre la toxicité du MG. Le système glyoxalase est la voie majoritaire pour la détoxification du MG (et du stress oxydant) (Kalapos, 2008 ; Smith et al., 1993). Il fait intervenir deux réactions enzymatiques successives et nécessite du glutathion. Ce cofacteur est généré dans le cytosol grâce à une autre voie de métabolisation du glucose, la voie des pentoses phosphates.

c. Voie des pentoses phosphates

Le glucose-6-phosphate peut être engagé dans une autre voie cytosolique, la PPP⁴⁷ (ou voie du phosphogluconate). Cette voie génère du NADPH⁴⁸, indispensable aux réactions de biosynthèse réductrice comme la synthèse des acides gras et des stéroïdes mais également du

⁴³ MG : MethylGlyoxal

⁴⁴ G3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate

⁴⁵ DHAP : DiHydroxyAcétone Phospahte

⁴⁶ AGEs : *Advanced Glycation End-products*

⁴⁷ PPP : *Pentose Phosphate Pathway*

⁴⁸ NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

ribose 5-phosphate, un pentose précurseur de la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques et des coenzymes (Ben-Yoseph et al., 1994).

La décarboxylation oxydante du G6P s'effectue en deux étapes respectivement catalysées par la G6PDH⁴⁹ et la 6PGD⁵⁰. La branche oxydante produit le R5P⁵¹ (**Figure 22**), qui s'isomérisé en ribose-5-phosphate et peut ainsi être utilisée dans la biosynthèse des nucléotides. En fonction du contexte cellulaire, une partie du R5P peut être recyclée en F6P⁵² et gagner la glycolyse. Enfin, le F6P peut aussi être isomérisé en G6P et G3P par la branche non-oxydante de la voie (Bolaños and Almeida, 2010). Au total, deux molécules de NADPH seront générées à partir de deux molécules de NADP⁺ et d'une molécule de G6P oxydée (Wamelink et al., 2008).

La réaction limitante de la PPP est catalysée par la G6PDH (**Figure 22**). Cette enzyme est sujette à des régulations allostériques et transcriptionnelles (Biswas et al., 2014) ; elle est par exemple activée par le peroxyde d'hydrogène ou la forme oxydée du GSH⁵³ (Eggleston and Krebs, 1974).

Dans le cerveau, la PPP joue un rôle anti-inflammatoire et neuroprotecteur majeur. (García-Nogales et al., 1999 ; Vaughn and Deshmukh, 2008). Le NADPH qu'elle génère permet le recyclage du GSH qui, lorsqu'il est sous sa forme réduite, assure l'élimination des dérivés réactifs de l'oxygène via la GSH peroxydase (**Figure 22**) (Bolaños and Almeida, 2010). La PPP est donc critique dans la prévention contre le stress oxydant et glycatif.

Cependant, l'activité de la PPP est bien plus élevée dans les astrocytes que dans les neurones (Ben-Yoseph et al., 1994) pour lesquels de récentes études révèlent que la branche non-oxydante serait négligeable (Herrero-Mendez et al., 2009). Le rôle de ces deux types cellulaires dans la protection contre le stress oxydant sera développé dans le **chapitre I.C.5** de cette partie.

⁴⁹ G6PDH : Glucose-6-Phosphate DésHydrogénase

⁵⁰ 6PGD : 6-PhosphoGluconate Déshydrogénase

⁵¹ R5P : Ribulose-5-Phosphate

⁵² F6P : Fructose-6-Phosphate

⁵³ GSH : Glutathion réduit

Ainsi, le G6P est à la fois le substrat de la PPP et celui de la glycolyse ; le choix relatif entre ces deux voies dépend des programmes métaboliques, des exigences cellulaires ponctuelles en énergie métabolique (ATP) et en précurseurs biosynthétiques (NADPH et ribose 5-phosphate). Alors que la glycolyse est ralentie lorsque la charge énergétique est élevée, la G6PDH (enzyme initiatrice de la PPP) est inhibée par une concentration élevée de NADPH et par les intermédiaires de la biosynthèse des acides gras.

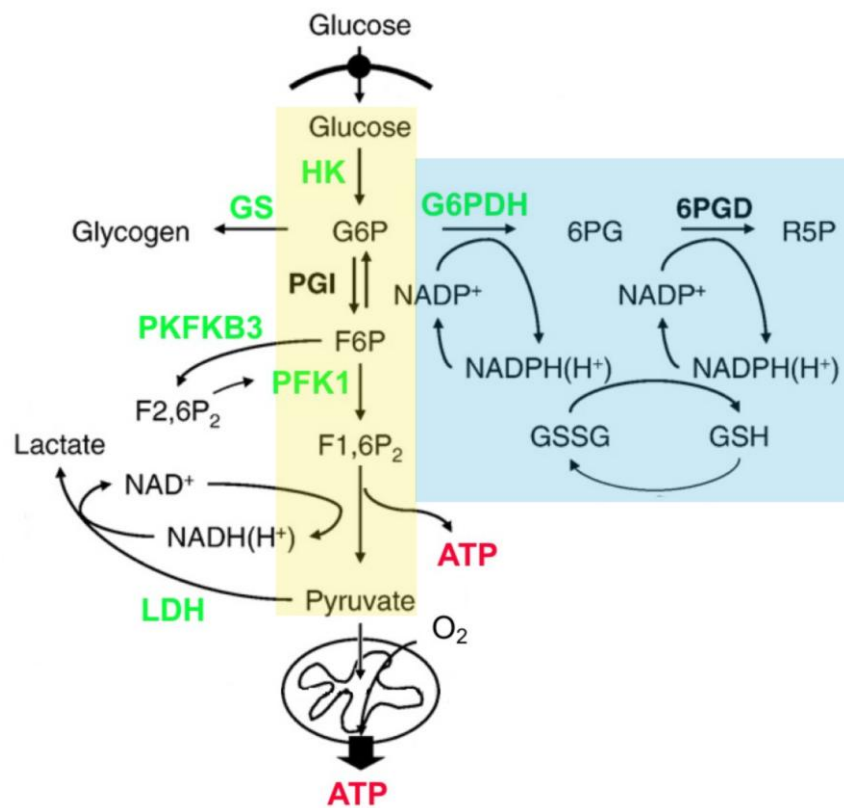
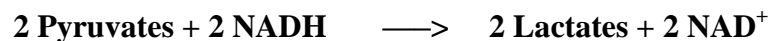


Figure 22 : Représentation schématique des réactions impliquées dans le métabolisme du glucose

Dans le cadre jaune se trouvent les étapes résumant la glycolyse ; dans le cadre bleu celles de la voie des pentoses phosphates. Les enzymes clés de la régulation des voies métaboliques sont représentées en vert. **HK** : hexokinase ; **G6PDH** : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; **PFK1** : phosphofructokinase-1 ; **PKFKB3** : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase, isoforme 3 ; **LDH** : lactate déshydrogénase. [Source : *Adapté de Bolanos et al., 2008*]

d. Glycolyse "aérobie"

Dans les cellules qui possèdent l'équipement enzymatique nécessaire, le pyruvate formé lors de la glycolyse peut être engagé dans un processus de glycolyse aérobie cytosolique. Lorsque le taux de la glycolyse excède celui de la phosphorylation oxydante, les cellules convertissent l'excédent de pyruvate en lactate (ou acide lactique) via la LDH⁵⁴. En outre, cette réaction permet de restaurer le NAD⁺, nécessaire au maintien de l'activité glycolytique. Elle peut être résumée par la formule suivante :



Le lactate ainsi produit peut sortir des cellules via des transporteurs spécifiques, les MCT⁵⁵ (Halestrap and Price, 1999) et être métabolisé dans d'autres cellules possédant elles aussi des MCT. Comme la LDH catalyse la réaction de transformation pyruvate-lactate dans les deux sens, il est possible d'utiliser le lactate environnant pour former directement du pyruvate sans passer par la glycolyse.

Bien que les neurones soient capables de produire du lactate, des études menées sur monocultures cellulaires mettent en évidence que les astrocytes en produisent en plus grande quantité (Walz and Mukerji, 1988). Le fait que les astrocytes libèrent du lactate et non du glucose, lors de la glycogénolyse, suggère que le lactate joue un rôle de substrat pour les cellules avoisinantes (Dringen et al., 1993a). Ce point sera développé dans la suite du manuscrit (I.C.1 et 3).

A défaut d'être transformé en lactate, le pyruvate peut rejoindre la mitochondrie où les réactions d'oxydoréductions initiées lors de la glycolyse vont se poursuivre avec un plus haut rendement énergétique.

³⁵ LDH : Lactate DesHydrogénase

⁵⁵ MCT : *MonoCarboxylate Transporters*

2. Transformation du pyruvate dans la mitochondrie

a. Formation d'acétyl-CoA

Le pyruvate pénètre dans la matrice mitochondriale par symport H^+ /pyruvate. Il est alors pris en charge par un complexe multienzymatique, le complexe pyruvate déshydrogénase, catalysant la décarboxylation du pyruvate. Le produit de cette réaction : l'ACoA va intégrer le cycle de Krebs.

b. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) est la voie terminale de l'oxydation des composés organiques (acides aminés, acides gras et carbohydrates). La plupart des molécules le rejoignent sous forme d'ACoA (**Figure 23**).

Ce cycle inclus une série de réactions d'oxydoréductions qui conduisent à la scission d'un groupe acétyle en deux molécules de dioxyde de carbone. Parallèlement, de nouvelles coenzymes réduites sont formées : trois molécules de NADH, H^+ et une de $FADH_2$ ⁵⁶ par tour de cycle. Une réaction d'oxydoréduction forme un thioester dont la coupure délivre l'énergie nécessaire pour phosphoryler un GDP ⁵⁷ en GTP ⁵⁸.

Le cycle de Krebs est aussi impliqué dans l'anabolisme, certains intermédiaires peuvent en être extraits pour servir de précurseurs à diverses biosynthèses (les acides aminés, les nucléotides ou encore la porphyrine).

De nombreuses enzymes de ce cycle sont des enzymes allostériques, cibles d'effecteurs qui participent à un contrôle strict de la voie. Cependant, l'apport en glucose et en oxygène doit être constant car la série de réactions est spontanément réversible.

³⁷ $FADH_2$: Flavine Adénine Dinucléotide sous sa forme réduite

³⁸ GDP : Guanosine DiPhosphate

³⁹ GTP : Guanosine TriPhosphate

3. Oxydation complète au sein de la chaîne respiratoire

Dans les années 1960, l'ATP était connue pour être la monnaie énergétique du vivant. On supposait alors que sa production dans la mitochondrie était due à un mécanisme de phosphorylation de substrat (i.e. l'ADP). Or, il avait été démontré à l'époque que l'intérieur des cellules était chargé négativement, ce qui créait une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane. Le biochimiste anglais Peter Mitchell fut le premier à réaliser que le déplacement des ions à travers une telle différence de potentiel électrochimique pouvait fournir l'énergie nécessaire à la production d'ATP.

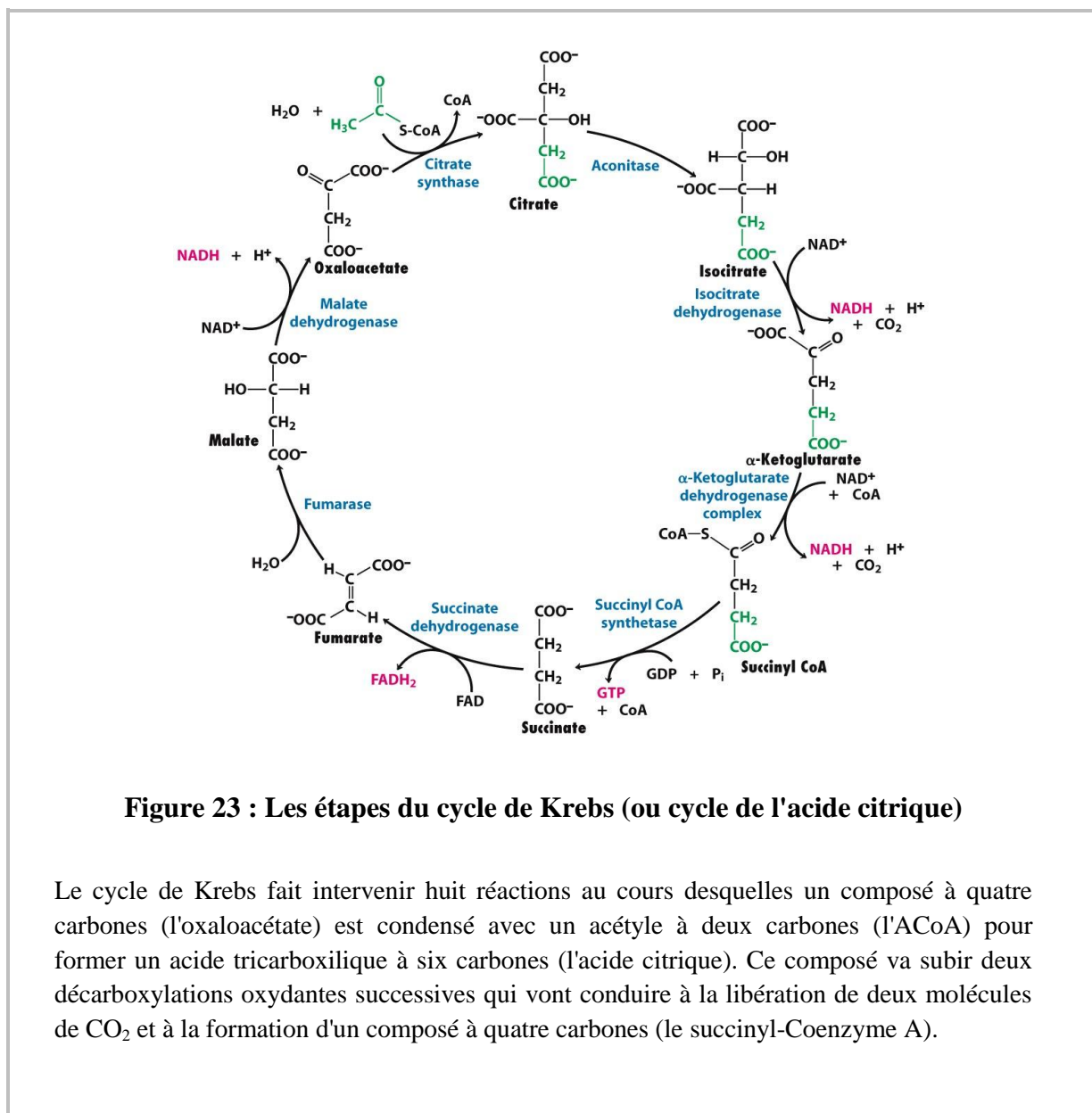


Figure 23 : Les étapes du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique)

Le cycle de Krebs fait intervenir huit réactions au cours desquelles un composé à quatre carbones (l'oxaloacétate) est condensé avec un acétyle à deux carbones (l'ACoA) pour former un acide tricarboxylique à six carbones (l'acide citrique). Ce composé va subir deux décarboxylations oxydantes successives qui vont conduire à la libération de deux molécules de CO₂ et à la formation d'un composé à quatre carbones (le succinyl-Coenzyme A).

Ce dernier est ensuite transformé pour régénérer l'oxaloacétate qui pourra initier un nouveau tour de cycle. Les enzymes catalysant les réactions sont en bleu, les coenzymes d'oxydoréduction et les composés énergétiques en rose. [Source : *Adapté de W. H. Freeman and Company, Biochemistry seventh edition, 2012*]

Le processus conduisant à la synthèse d'ATP dans la mitochondrie fait intervenir un couplage électrochimique dont les étapes seront brièvement présentées ici (voir Cooper, 2000 pour revue).

a. Oxydation des coenzymes réduites et formation d'un gradient de protons

Les coenzymes réduites générées par les réactions du cycle de Krebs (i.e. NADH et FADH₂) sont réoxydées au niveau de la chaîne respiratoire. Cette chaîne, composée de cinq complexes protéiques, d'une ubiquinone et d'un cytochrome C, est insérée dans la membrane interne de la mitochondrie (**Figure 24**). Chaque composant de la chaîne peut transporter des électrons (à l'exception du complexe V) et des protons (à l'exception du cytochrome C).

Le transfert des électrons se fait spontanément selon des potentiels redox croissant, depuis le couple donneur (NADH/NAD⁺ ou FADH₂/FAD⁵⁹) jusqu'au couple O₂/H₂O, le long de la chaîne respiratoire (**Figure 24**). Il est couplé à une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire des mitochondries. Ce couplage chimio-osmotique est à l'origine d'une différence de potentiel électrochimique de protons : un gradient s'établit de part et d'autre de la membrane.

b. Synthèse d'ATP dans la matrice mitochondriale

La découverte de l'ATP synthase, est attribuée à André Jagendorf. Ce chercheur américain a réalisé que, chez la plante, la production d'ATP était permise par une différence de pH entre deux compartiments internes du chloroplaste.

⁴⁰ FAD : Flavine Adénine Dinucléotide sous sa forme oxydée

L'ATP synthase (ou complexe V) est un édifice enzymatique transmembranaire de masse supérieure à 500 kDa qui utilise la force protonmotrice générée par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP. La diffusion des protons au travers de l'ATP synthase depuis l'espace intermembranaire (où ils ont été concentrés) vers la matrice mitochondriale permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Une molécule de glucose permet de générer environ 30 molécules d'ATP dans la matrice mitochondriale. Elles seront ensuite transférées dans le cytosol via un antiport ATP/ADP.

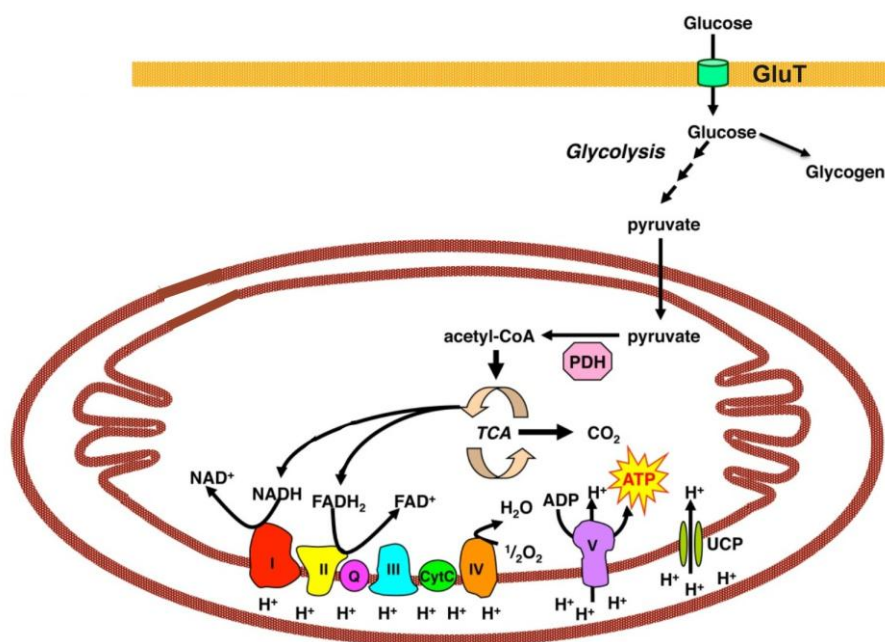


Figure 24 : Les composants de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le pyruvate produit lors de la glycolyse cytosolique est transféré dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-Coenzyme A par le complexe pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-Coenzyme A rejoint le cycle de l'acide citrique au sein duquel du CO₂ ainsi que des coenzymes réduites vont être produits. Ces coenzymes vont permettre un transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire et conduire à la réduction du dioxygène en eau. Ce transfert d'électrons permet de concentrer les protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie par couplage chimio-osmotique. Une différence de potentiel électrochimique (ou force proton-motrice) s'établit entre la matrice et l'espace intermembranaire, permettant la synthèse d'ATP par l'ATP synthase.

Les neurones (et en particulier les interneurons) sont très riches en mitochondries, indiquant une phosphorylation oxydante très active (Gulyás et al., 2006). Dans les astrocytes, au contraire, la capture de glucose et la glycolyse aérobie sont plus importants que le métabolisme oxydant (Ebert et al., 2003 ; Lebon et al., 2002 ; Nehlig et al., 2004).

Cycle de Krebs et respiration mitochondriale sont généralement vus comme des processus jouant de concert avec la glycolyse qui fournit le substrat nécessaire à la phosphorylation oxydante (i.e. le pyruvate). Cependant, dans le cerveau, ces processus sont compartimentés et dépendent d'interactions complexes entre le réseau neuronal et le réseau astroglial (Allaman et al., 2011 ; Iadecola, 2004 ; Rouach et al., 2008).

C. Le métabolisme du glucose nécessite des interactions étroites entre astrocytes et neurones

Lorsque Golgi observe la morphologie des astrocytes dans les années 1880, il remarque le contact direct entre les prolongements astrocytaires et les vaisseaux sanguins. Il suggère alors que les astrocytes pourraient avoir une fonction nutritive en plus de leur rôle de soutien (Golgi, 1886 ; Holmgren, 1901).

Les avancées en immunohistochimie et en microscopie électronique et à fluorescence ont confirmé la position idéale des astrocytes entre la BHE et les neurones. Les prolongements astrocytaires couvrent les vaisseaux sanguins, tapissant presque l'intégralité du lit vasculaire (**Figure 25**) (Iadecola and Nedergaard, 2007 ; Kacem et al., 1998 ; McCaslin et al., 2011).

En 1959, Hyden met au point une technique permettant d'observer individuellement l'activité métabolique des cellules (Hyden et al., 1958 ; Hyden, 1959 ; Hydén et al., 2000). A la suite d'une stimulation nerveuse, il observe une forte activité glycolytique dans les astrocytes contre une forte activité oxydante dans les neurones. Il postule alors l'existence d'une coopération entre les deux types cellulaires (Hamberger and Hyden, 1963). Pendant plus de 30 ans, la nature précise de cette interaction reste inconnue mais l'avènement des techniques de cultures cellulaires a rendu possible l'exploration des propriétés métaboliques d'un type cellulaire isolé.

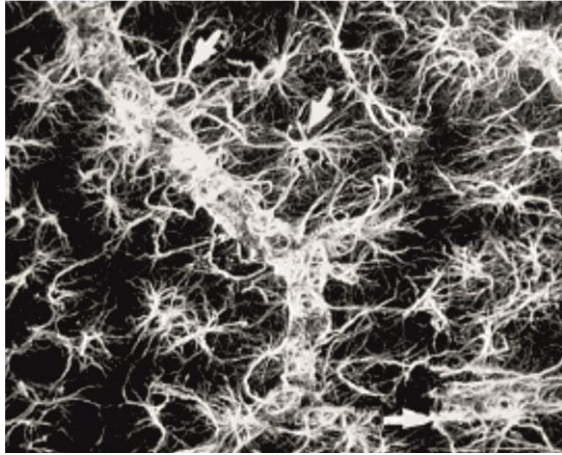


Figure 25 : Les astrocytes recouvrent la totalité du lit vasculaire

Marquage immunocytochimique des astrocytes avec un anticorps dirigé contre la protéine spécifiquement astrocytaire GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*). [Source : Adapté de *Kacem, 1998*]

1. Les astrocytes libèrent du lactate, substrat énergétique pour les neurones

En 1988, les études réalisées par Walz et Mukerji mettent en évidence une importante production de lactate dans les astrocytes par rapport aux neurones (Walz and Mukerji, 1988). Dans les astrocytes, le lactate est le produit final de la glycogénolyse et de la glycolyse ; il est libéré dans l'espace extracellulaire grâce à des protéines spécifiques : les MCT (Dringen et al., 1993b ; Magistretti et al., 1993).

Si le lactate a longtemps été considéré comme un déchet métabolique devant être évacué du parenchyme cérébral (Dienel and Hertz, 2001), les recherches accumulées ces cinquante dernières années révèlent qu'il est l'un des rares substrats alternatifs au glucose (Boumezbeur et al., 2010 ; McILWAIN, 1953 ; Pellerin, 2003). Sa concentration interstitielle chute instantanément après une activation neuronale avant de remonter significativement (Barros, 2013 ; Caesar et al., 2008), ce qui suppose qu'il est utilisé immédiatement en cas de forte demande énergétique. Des études réalisées sur des cultures primaires de neurones appuient cette hypothèse en montrant qu'en présence de glucose et de lactate, ce dernier était le substrat préférentiellement utilisé par les neurones (Bouzier-Sore et al., 2003, 2006 ; Itoh et al., 2003 ; Ivanov et al., 2011).

On sait aujourd'hui que l'utilisation de lactate par le cerveau est essentielle pour divers mécanismes neurophysiologiques comme le contrôle de la respiration (Erlichman et al., 2008) ou la régulation de la prise alimentaire (Parsons and Hirasawa, 2010). Il a été également établi

que le lactate avait un rôle critique dans le couplage neurovasculaire (Gordon et al., 2008), la récupération après une hypoxie (Schurr et al., 1997) et la neuroprotection (Berthet et al., 2009 ; Bliss et al., 2004).

Au même titre que le pyruvate et les corps cétoniques, le lactate est transporté à travers les différents types cellulaires du cerveau grâce à des transporteurs de type MCT (Bergersen, 2007). La découverte de transporteurs spécifiques à la membrane des astrocytes et des neurones laisse penser qu'il existe un transfert de lactate des premiers aux seconds (Koehler-Stec et al., 1998). Les isoformes MCT1 et 4, qui ont une faible affinité pour le lactate et une forte capacité de transport, sont localisées à la membrane des astrocytes. Ces derniers sont donc susceptibles de libérer facilement une importante quantité de lactate (Halestrap and Price, 1999). A l'inverse, le transporteur MCT2, qui présente une forte affinité pour son substrat, est détecté dans les neurones. Il assure une entrée de lactate même lorsque les concentrations baissent dans l'espace extracellulaire (Pierre et al., 2009).

Proposée par Luc Pellerin et Pierre Magistretti, l'hypothèse de la navette du lactate stipule que le lactate, joue un rôle pivot en tant que substrat neuronal (Pellerin, 2003). Lors de l'activité neuronale, la libération de glutamate et son recyclage stimulerait la glycolyse et la production de lactate dans les astrocytes. Celui-ci serait ensuite transféré dans les neurones pour servir de substrat énergétique via le métabolisme oxydant (**Figure 26**) (Pellerin and Magistretti, 1994).

Le glutamate libéré des synapses est identifié comme signal neuronal et déclenche une recapture du glucose sanguin par les astrocytes. Ce mécanisme entraîne l'activation des cotransporteurs glutamate/ Na^+ astrocytaires (Cholet et al., 2001 ; Voutsinos-Porche et al., 2003). L'augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ dans les astrocytes induit l'activation de la pompe Na^+/K^+ ATPase. En parallèle, la transformation du glutamate en glutamine va s'accompagner d'une hydrolyse d'ATP. La forte demande en ATP ainsi créée va stimuler la capture du glucose sanguin et la glycolyse astrocytaire. Le glucose sera transformé en pyruvate puis en lactate pour être finalement libéré par les astrocytes et prélevé par les neurones (**Figure 26**).

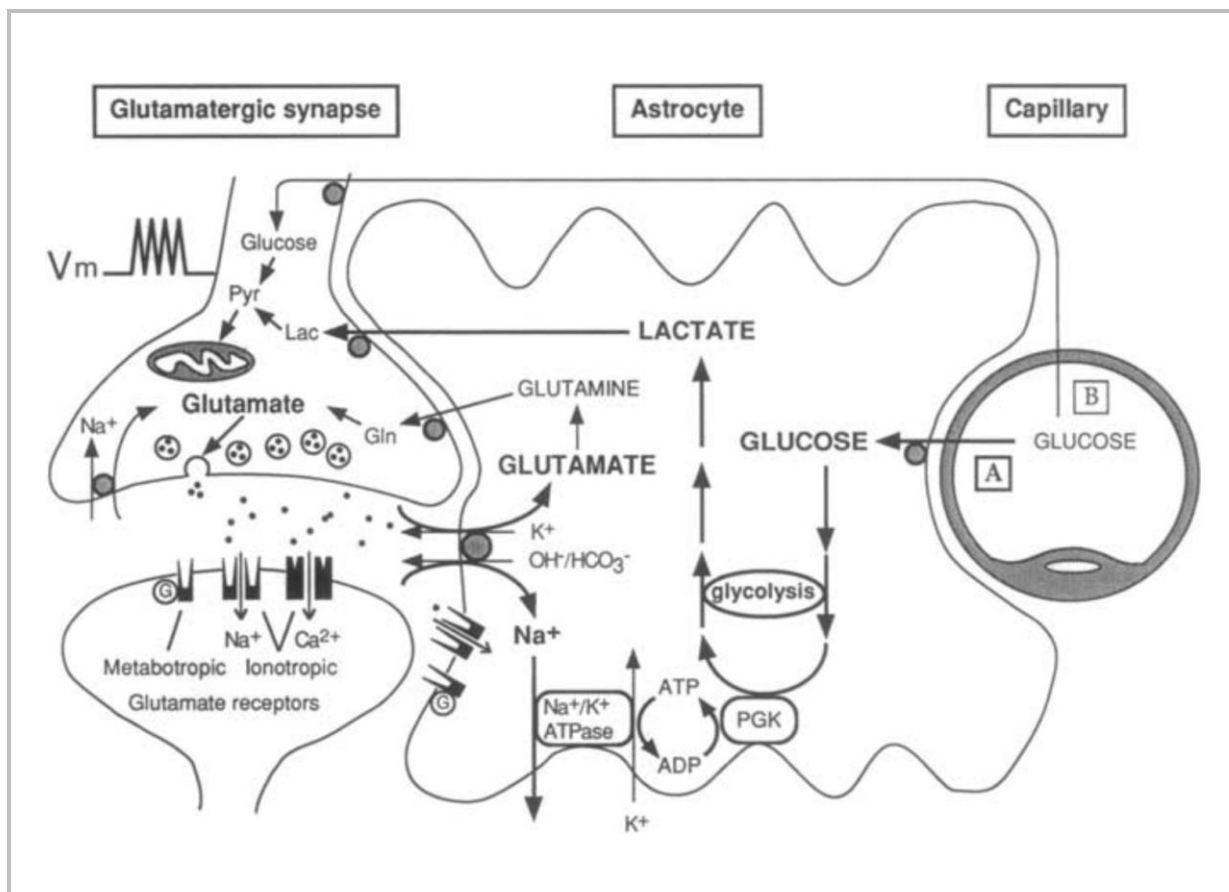


Figure 26 : Hypothèse historique de la navette du lactate : activation de la glycolyse astrocytaire par le glutamate

Le glutamate libéré au niveau de la synapse dépolarise le neurone postsynaptique avant d'être capturé par les astrocytes via un système de cotransport glutamate/ Na^+ . L'entrée de Na^+ active la pompe Na^+/K^+ ATPase qui consomme de l'ATP et stimule la glycolyse astrocytaire. Le lactate issu de la glycolyse est libéré dans l'espace extracellulaire puis capté par les neurones qui l'utilisent comme substrat énergétique. [Source : *Pellerin et Magistretti 2012*]

Cet effet métabolique ne serait pas dû aux récepteurs du glutamate mais aux transporteurs de glutamate, EAAT1-5 (Pellerin and Magistretti, 1994). 5 sous-types de transporteurs d'acides aminés excitateurs ont été clonés jusqu'à présent, ils présentent des structures, des fonctions et des profils d'expression bien distincts (Arriza et al., 1994 ; Kanai, 1997). Ces transporteurs régulent étroitement le niveau de glutamate extracellulaire au sein de la fente synaptique afin de garantir une transmission fidèle de l'influx nerveux et prévenir des dommages causés par l'activation excessive des récepteurs au glutamate (Hajós et al., 1986 ; Nicholls and Attwell, 1990 ; Rothstein et al., 1996).

De nombreux travaux sont venus renforcer ou compléter l'hypothèse de Pellerin et Magistretti. L'invalidation des gènes des cotransporteurs Na^+ /Glutamate conduit à une diminution de l'utilisation de glucose lors d'une activation neuronale (Cholet et al., 2001 ; Voutsinos-Porche et al., 2003). Des études *in vivo* sont allées plus loin en montrant que l'augmentation d'utilisation du glucose est due à une activité glycolytique astrocytaire accrue (Chuquet et al., 2010). Le mécanisme qui permettrait de stimuler la capture de glucose sanguin en revanche demeure mal compris.

Des recherches sur les réseaux astrocytaires (Rouach et al., 2008) viennent étoffer l'hypothèse initiale de la navette du lactate. L'accroissement de l'activité glutamatergique entraînerait une augmentation de l'apport énergétique par le lactate, non seulement au niveau des synapses actives, mais aussi dans les neurones environnants. Ce phénomène est rendu possible grâce à l'étendue du réseau astrocytaire au sein duquel les jonctions communicantes permettent la diffusion des substrats énergétiques aux astrocytes voisins (Giaume et al., 2010 ; Houades et al., 2008). Ainsi l'augmentation de la capture du glucose et la production de lactate par les astrocytes auraient lieu sur toute une région autour du site initial de libération et de recyclage du glutamate et/ou du K^+ .

En plus d'augmenter la capture du glucose par les astrocytes, le glutamate inhiberait le transport de glucose dans les neurones (Porrás et al., 2004, 2008). L'augmentation de la concentration en lactate lors de l'activité neuronale et sa conversion en pyruvate dans les neurones entraîne une réduction de NAD en NADH (Williamson et al., 1967). Cette modification de l'état redox de la cellule inhiberait aussi la glycolyse (Cerdán et al., 2006 ; Ramírez et al., 2007). Ainsi, en période d'activité neuronale, le transport et l'utilisation directe du glucose par les neurones serait inhibés au profit du lactate².

Toutefois, des études récentes montrent que la stimulation de la glycolyse astrocytaire par le glutamate possède une cinétique relativement lente (Bittner et al., 2011 ; Caesar et al., 2008 ; Choi et al., 2012). Ce mécanisme interviendrait sur le long terme. Le potassium, libéré dans la fente synaptique pendant une transmission neuronale, stimulerait très rapidement la glycolyse astrocytaire et ce de manière réversible. Il est donc possible que plusieurs mécanismes aux cinétiques différentes interviennent dans le fonctionnement de la navette du lactate (Choi et al., 2012).

L'hypothèse selon laquelle le lactate serait la principale source d'énergie consommée par le neurone est remise en question dans une publication de Simpson et al. (Simpson et al., 2007 ; Sokoloff et al., 1977). En modélisant les caractéristiques cinétiques et les concentrations cellulaires respectives des transporteurs du glucose et du lactate dans les neurones et dans la glie, l'étude conclue que le lactate interstitiel résulterait de l'excès de la glycolyse neuronale plutôt qu'astrocytaire.

Il est tout à fait envisageable qu'à l'état basal, le glucose soit capturé et métabolisé dans les neurones et que l'approvisionnement en lactate par les astrocytes ait lieu essentiellement en période de haute demande énergétique (Serres et al., 2008 ; Simpson et al., 2008). Par ailleurs, le lactate astrocytaire peut provenir de différentes sources.

2. Les astrocytes assurent la recapture du glutamate issu de l'activité synaptique

La concentration extracellulaire de glutamate doit être finement contrôlée afin de ne pas dépasser un seuil critique au-delà duquel il s'avère toxique pour les cellules (Rothstein et al., 1996).

En 1994, Luc Pellerin et Pierre Magistretti émettent l'hypothèse que l'ATP requis pour le recyclage du glutamate (cf. **Partie I.A.2.b**) est fourni par la glycolyse astrocytaire (Pellerin and Magistretti, 1994). En effet, la membrane des astrocytes présente des transporteurs de haute affinité pour le glutamate GLT-1⁶⁰ et GLAST⁶¹ (Cholet et al., 2001 ; Danbolt, 2001 ; Rothstein et al., 1994). De plus, le recyclage du glutamate implique sa transformation en glutamine, or l'astrocyte est le seul type cellulaire à posséder l'enzyme qui catalyse cette réaction : la glutamine synthétase (Martinez-Hernandez et al., 1977). De fait, la grande majorité du glutamate capté par les astrocytes (~80%) est transformée en glutamine (McKenna et al., 1996). La glutamine est alors libérée dans l'espace extracellulaire puis capturée par les neurones via leur transporteurs EAAC1 et EAAT4⁶² (Rothstein et al., 1994 ;

⁶⁰ GLT-1 : *GLial glutamate Transporter 1*

⁶¹ GLAST : *GLutamate ASpartate Transporter*

⁶² EAAT4 : *Excitatory AminoAcid Ttransporter 4*

Yamada et al., 1996). Une fois dans le cytosol des neurones, une glutaminase retransformera la glutamine en glutamate (Bröer and Brookes, 2001).

3. Contrairement aux neurones, les astrocytes possèdent des réserves de glycogène

L'accumulation de glycogène dans les neurones est pathologique (Duran et al., 2012). Bien qu'ils possèdent l'équipement enzymatique nécessaire à sa synthèse, la production du glycogène est empêchée par le maintien permanent de l'enzyme, impliquée dans sa formation, la MGS⁶³, dans un état phosphorylé inactif (Vilchez et al., 2007).

Il n'en est pas de même chez les astrocytes qui détiennent les principales réserves de glycogène cérébral ainsi que l'enzyme qui permet sa dégradation : la glycogène phosphorylase (Brown, 2004 ; Cataldo and Broadwell, 1986 ; Koizumi, 1974 ; Pfeiffer-Guglielmi et al., 2003 ; Phelps, 1972).

Cette réserve d'énergie peut être mobilisée par différents modulateurs (la noradrénaline, le VIP, l'adénosine ou même l'élévation de potassium extracellulaire) (Choi et al., 2012 ; Hof et al., 1988 ; Magistretti et al., 1981, 1993).

La technique de spectroscopie RMN du carbone 13 appliquée chez le rongeur a permis de constater qu'en condition basale, le métabolisme du glycogène est lent dans le cerveau (Gruetter, 2002). L'utilisation des réserves de glycogène astrocytaire est stimulée par l'activité neuronale (Cruz and Dienel, 2002; Swanson, 1992) et l'insuffisance en substrat énergétique (Choi et al., 2003 ; Lewis et al., 1974). Des travaux menés sur culture cellulaire de nerf optique ont également montré que les stocks de glycogène astrocytaire augmentait la survie neuronale et les fonctions axonales en cas de déprivation de glucose (Brown et al., 2005 ; Swanson and Choi, 1993 ; Wender et al., 2000).

Des études *in vitro* ont suggéré par la suite que le lactate ou le pyruvate dérivé du glycogène astrocytaire pouvait être utilisé par les neurones pour le métabolisme oxydant (Brown et al., 2005 ; Dringen et al., 1993a ; Poitry-Yamate et al., 1995 ; Tekkök et al., 2005) et que l'activité neuronale stimulait la glycogénolyse astrocytaire, conduisant à une production de G6P (Hertz

⁶³ MGS : *Muscular Glycogen Synthase*

et al., 2007). Les réserves en glycogène des astrocytes servent aussi à assurer leurs propres besoins énergétiques (Dienel and Cruz, 2004 ; Swanson, 1992).

En plus de fournir l'ATP et les composants essentiels à l'anabolisme, le métabolisme du glucose permet la protection contre le stress oxydant. Ici encore, une collaboration entre les différents types cellulaires est requise.

4. La protection contre le stress oxydant nécessite une collaboration entre les deux types cellulaires

a. La respiration neuronale produit des dérivés actifs de l'azote et de l'oxygène

Les cellules du cerveau consomment environ 20% de l'oxygène utilisé par le corps, les ROS⁶⁴, qui sont générées en permanence durant le métabolisme oxydant, sont donc produites en grande quantité.

Certaines cellules du cerveau produisent également du NO⁶⁵ à partir de la NOS⁶⁶ (Murphy et al., 1993 ; Palmer et al., 1988). Dans les neurones, le NO est produit transitoirement via l'activation Ca²⁺-calmoduline-dépendante de la NOS1. Dans les cellules gliales, sa synthèse nécessite l'expression transcriptionnelle de la NOS2 inductible qui, contrairement à l'isoforme neuronale, est Ca²⁺-calmoduline indépendante (Murphy et al., 1993).

Le NO joue de nombreux rôles physiologiques comme par exemple la modulation de la transmission synaptique ou le couplage neurovasculaire (Duchemin et al., 2012). En revanche, une production excessive de ce composé est impliquée dans des phénomènes d'excitotoxicité suite à l'activation persistante des récepteurs postsynaptiques du glutamate (Garthwaite et al., 1988 ; Schulz et al., 1995). En effet, la stimulation anormale ou excessive de ces récepteurs, principalement le sous-type NMDA, va provoquer une accumulation de

⁶⁴ ROS : *Reactive Oxygen Species*

⁶⁵ NO : *Nitric Oxide*

⁶⁶ NOS : *Nitric Oxide Synthase*

calcium intracellulaire qui va activer la NOS neuronale et générer une forte production de NO.

Le NO réagit spontanément avec l'anion superoxyde, principalement produit par la chaîne respiratoire (Murphy, 2009). Ils vont former du peroxynitrite (ONOO⁻) (Blough and Zafiriou, 1985), composé qui est rapidement protoné à pH physiologique et dont la décomposition conduit à la formation d'espèces chimiques pro-oxydantes (Beckman et al., 1990 ; Bolaños et al., 1997).

Le NO et ses dérivés participent à la neurotoxicité par des mécanismes d'altération de l'ADN (Zhang et al., 1994), de peroxydation lipidique (Radi et al., 1991) et de dysfonctions mitochondriales (Bolaños et al., 1997). Cette série d'événements est collectivement désignée comme stress nitrosatif et est supposée tenir un rôle majeur dans les processus de neurodégénérescence (Knott et al., 2008).

La détoxification du cerveau est une tâche essentielle dans laquelle le glutathion joue un rôle prédominant. Il est impliqué dans l'évacuation des peroxydes et la protection contre les ROS. En coculture, les cellules gliales protègent les neurones contre la toxicité de nombreux composés. Cette protection serait permise par un approvisionnement en précurseur de glutathion (Dringen, 2000).

b. Les réserves antioxydantes des neurones sont limitées

Le GSH est l'antioxydant le plus abondant chez les mammifères. Il est synthétisé en deux étapes successives. La première réaction est cinétiquement limitante ; elle est catalysée par la GCL⁶⁷ qui nécessite une molécule d'ATP pour synthétiser la γ -glutamylcystéine (Dringen, 2000). Lors de la seconde étape, une glycine est liée à la γ -glutamylcystéine par la glutathion synthétase pour former le GSH (**Figure 28**).

⁶⁷ GCL : Glutamate-Cystéine-Ligase

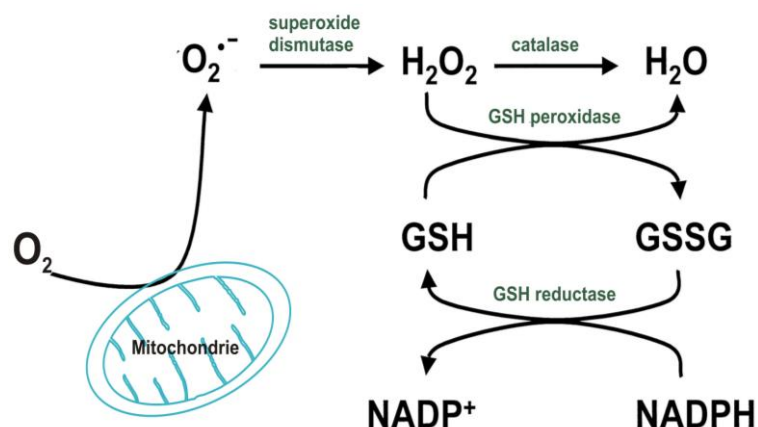


Figure 28 : Voie de production et d'élimination des ROS

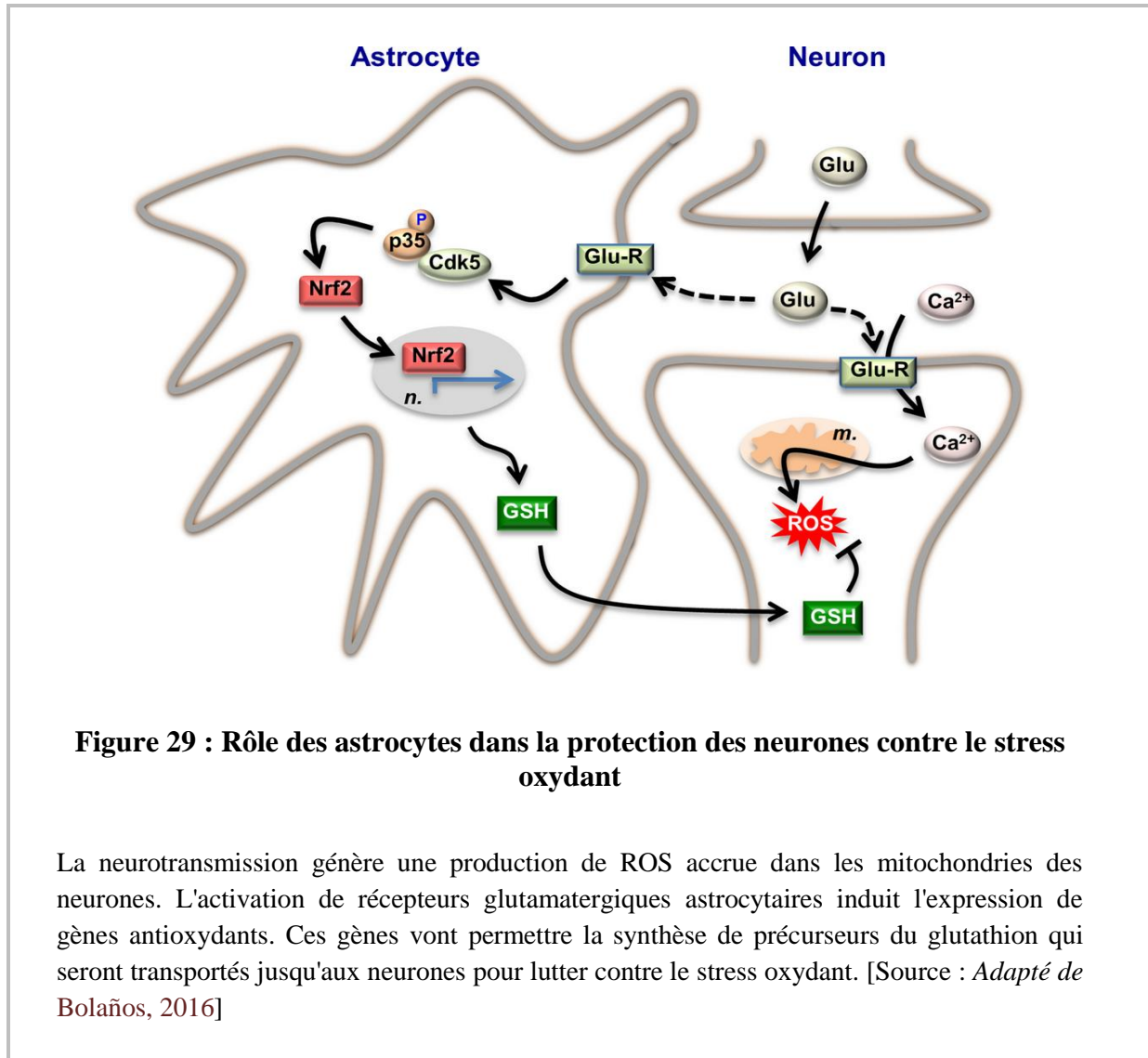
Dans la mitochondrie, le catabolisme oxydant produit des ions superoxydes à l'origine du stress oxydant. Ces anions sont transformés en peroxyde d'hydrogène par une première réaction catalysée par la superoxyde dismutase puis réduits en H_2O grâce à l'oxydation du glutathion. Le glutathion est régénéré (i.e. réduit) grâce au NADPH produit par la voie des pentoses phosphates. Les enzymes sont indiquées en vert. GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé (disulfure). [Source : Dröge, 2002]

Le GSH est connu pour son rôle neuroprotecteur (Bolaños et al., 1996). Il est utilisé comme cofacteur lors de l'inactivation du peroxyde d'hydrogène par la GR⁶⁸ (Dringen, 2000). Bien qu'il soit synthétisé dans le cytosol, le GSH peut être transporté dans des organites comme la mitochondrie où il exerce une défense importante contre les dommages causés par le stress nitrosatif sur l'ADN, les lipides et les protéines (Heales and Bolaños, 2002).

Des expériences menées sur des neurones en culture ont montré que ces derniers mourraient rapidement lorsqu'ils étaient incubés avec des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène (Bolaños et al., 1996) à moins qu'on ne leur fasse artificiellement surexprimer la GCL (Diaz-Hernandez et al., 2005). En effet, l'activité enzymatique et la concentration de la GCL sont plus faibles dans les neurones (Diaz-Hernandez et al., 2005 ; Makar et al., 1994) que dans les astrocytes (Ben-Yoseph et al., 1994 ; Makar et al., 1994) et conduisent à une concentration en

⁶⁸ GR : Glutathion Réductase

GSH moitié moins importante (Bolaños et al., 1995 ; Makar et al., 1994 ; Sagara et al., 1993). Ainsi, la faible abondance de GSH dans les neurones leur confère une fragilité antioxydante.



Une protection contre les molécules oxydantes est apportée lorsque les deux types cellulaires sont mis en culture ensemble. Cette protection serait permise par un approvisionnement des neurones en précurseurs de la γ -glutamylcystéine afin qu'ils synthétisent du GSH (Bolaños et al., 1995 ; Dringen et al., 1999 ; Sagara et al., 1993).

c. Le métabolisme du glucose protège du stress oxydant via la voie des pentoses phosphates

Dans des neurones en culture, l'inhibition de la PPP sensibilise à l'oxydation du glutathion et à la mort apoptotique tandis que la stimulation de cette voie confère une résistance au stress nitrosatif. La GPD est rapidement activée par le peroxy-nitrite via un mécanisme qui régule positivement l'activité PPP et augmente la capacité des neurones à régénérer le GSH à partir du GSSG⁶⁹ (García-Nogales et al., 2003).

La glycolyse et la PPP sont connectées au niveau du G6P (voir **Figure 22** et **chapitres I.B.1.b et I.B.1.c** de l'introduction). De récentes études révèlent que les neurones peuvent inhiber leur glycolyse pour utiliser préférentiellement le glucose via la PPP. Cette inhibition est permise par la dégradation continue de la PFKFB3⁷⁰, dont le produit (le F2,6BP⁷¹) est un effecteur allostérique positif de la glycolyse (Bolaños and Almeida, 2010).

Ainsi, la fragilité antioxydante des neurones peut être compensée par la stimulation de la PPP au détriment de la glycolyse. La faible utilisation du glucose via la glycolyse est essentielle pour le statut antioxydant des neurones et peut être couplée à l'oxydation mitochondriale de substrats alternatifs, comme le lactate, pour subvenir aux besoins énergétiques des cellules.

Le glucose sanguin permet de couvrir la quasi-totalité de la forte demande énergétique cérébrale. En plus d'être compartimenté au sein des cellules, le métabolisme du glucose met à contribution différents types cellulaires en étroite relation.

L'altération d'un des compartiments et/ou d'un des types cellulaires mis en jeu peut conduire à des dysfonctions cérébrales associées à des pathologies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer (Iadecola, 2004).

⁶⁹ GSSG : Glutathion sous sa forme oxydé

⁷⁰ PFKFB3 : 6-PhosphoFructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase-3

⁷¹ F2,6BP : Fructose 2,6 BisPhosphate

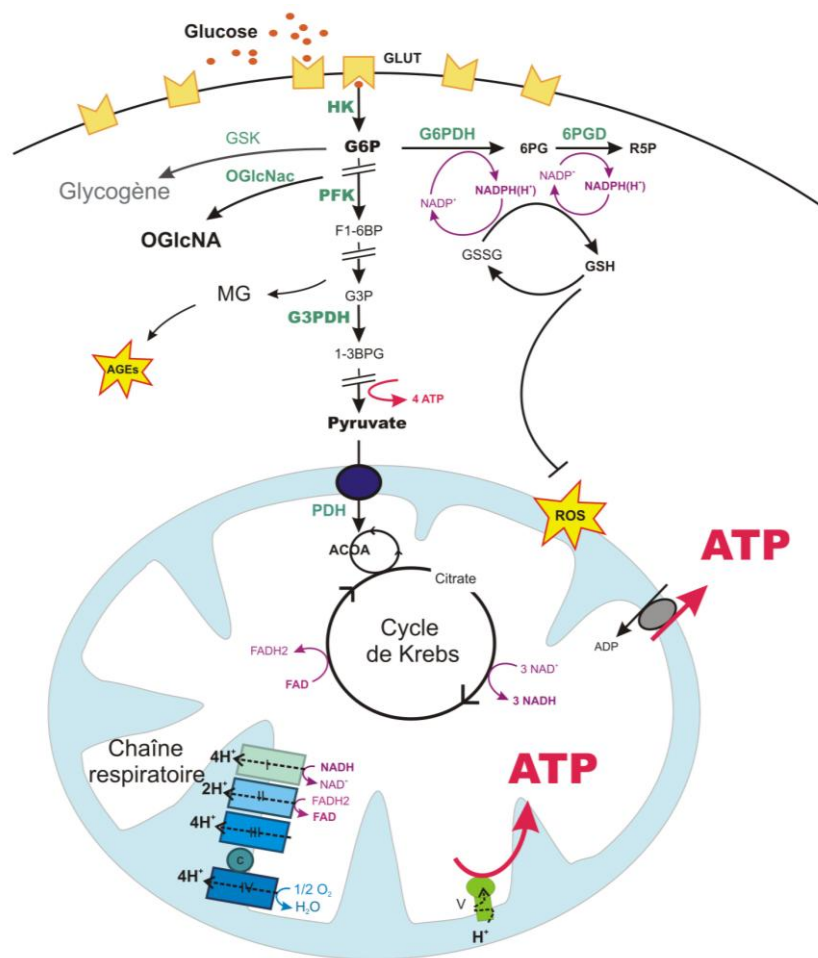


Schéma bilan : Métabolisme du glucose neuronal en condition normale

Le glucose est transporté dans la cellule grâce aux **GlutTs**, puis est rapidement phosphorylé par l'**HK**. Le **G6P** est au carrefour entre glycolyse, voie des pentoses phosphates et néoglucogénèse. Cette dernière voie est très peu empruntée dans les neurones car l'enzyme qui en est responsable est constamment dégradée. La glycolyse fournit de l'**ATP** et une partie du pyruvate nécessaires à la phosphorylation oxydante mitochondriale. La voie des **PPP** fournit du **GSH**, un puissant antioxydant qui limite la toxicité des **ROS** et du **MG**. Le **OGlcNA** utilise 2 à 5% de l'énergie produite par le métabolisme du glucose et permet la modification dynamique des protéines. Le **MG** est généré par une glycolyse excessive et conduit à la formation d'**AGEs** toxiques pour la cellule. Dans la mitochondrie, le cycle de Krebs fournit les coenzymes qui permettront la création d'un gradient de protons au sein de la chaîne respiratoire. L'ATP-synthase pourra alors produire l'**ATP** nécessaire à la haute demande énergétique des neurones. Le rôle des astrocytes dans le métabolisme neuronal n'est pas représenté ici. Les enzymes sont indiquées en vert, les coenzymes en rose et les intermédiaires métaboliques en noir (se reporter à la liste p.16-17 pour les abréviations).

II. Le métabolisme du glucose est altéré dans la pathologie Alzheimer

Touchant plus de 35 millions de personnes dans le monde, la MA est la plus commune des maladies neurodégénératives. Cette démence liée à l'âge se manifeste par une perte progressive des capacités cognitives et de la mémoire. La pathologie se caractérise par des dysfonctionnements synaptiques et une dégénérescence neuronale associés à une accumulation cérébrale de peptides amyloïdes bêta (A β) conduisant à la formation de plaques insolubles et à l'apparition plus tardive d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFT⁷²).

Les avancées de la recherche sur la MA constituent un enjeu sociétal majeur car d'ici 2050, plus de 115 millions de personnes seront touchées par la pathologie (Povova et al., 2012 ; Alzheimer's Disease International, 2015). En raison du manque de connaissance des mécanismes qui initient la maladie et génèrent sa propagation, les patients sont uniquement traités par des thérapies symptomatiques peu efficaces.

A. Caractéristiques anatomopathologiques de la maladie d'Alzheimer

C'est en 1906, lors d'un congrès à Tübingen, qu'Alois Alzheimer décrit pour la première fois les symptômes associés aux démences (Berchtold and Cotman, 1998 ; Zilka and Novak, 2006). L'étude *post mortem* du cerveau d'un de ses patients permet au psychiatre d'identifier une atrophie du cortex et la présence d'amas neurofibrillaires (NFT) et de plaques séniles. Ces deux derniers signes se sont avérés suffisamment caractéristiques pour garantir le diagnostic de la démence sénile bientôt renommée maladie d'Alzheimer (**Figure 30**).

1. Périodes cliniques et évolution de la pathologie

Si la majeure partie des cas de MA est sporadique, il existe des facteurs de prédisposition génétique. Cependant moins de 1% des cas est concerné par cette forme de MA dite familiale (Campion et al., 1999 ; Sandbrink et al., 1996).

⁷² NFT : *NeuroFibrillary Tangles*

Comme le tableau clinique de la MA est très hétérogène et puisqu'il n'existe pas de test spécifique, le diagnostic clinique de la MA est annoncé par le médecin comme "probable" et ne se verra confirmé qu'après examen histopathologique du cerveau à l'autopsie.

L'apparition clinique de la MA peut être divisée en 3 grandes périodes : préclinique, MCI⁷³ et démence (Dubois et al., 2014 ; McKhann et al., 2011). La durée de chacune d'elle est de l'ordre de la décennie.

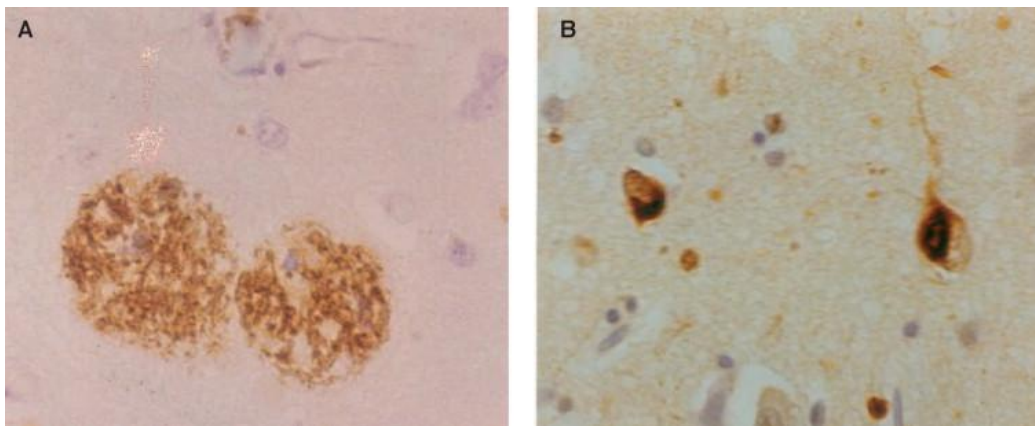


Figure 30 : Lésions caractéristiques de la MA visualisées par immunohistochimie sur tranche de cortex

A. Plaques séniles principalement constituées de dépôts amyloïdes. **B.** NFT principalement composés de protéines Tau hyperphosphorylées, formant des corps d'inclusion à l'intérieur des neurones. [Source : Armstrong, 2009]

2. Accumulations protéiques constituant les lésions spécifiques de la MA

Le cerveau atteint de la MA est caractérisé par la présence de deux types de lésions : les plaques amyloïdes, qui sont des agrégats extracellulaires de protéine A β (Glennier and

⁷³ MCI : *Mild Cognitive Impairment*

Wong, 1984) et les NFT intracellulaires, principalement composés de protéines Tau hyperphosphorylées (**Figure 30**) (Goedert et al., 1992 ; Iqbal et al., 2016).

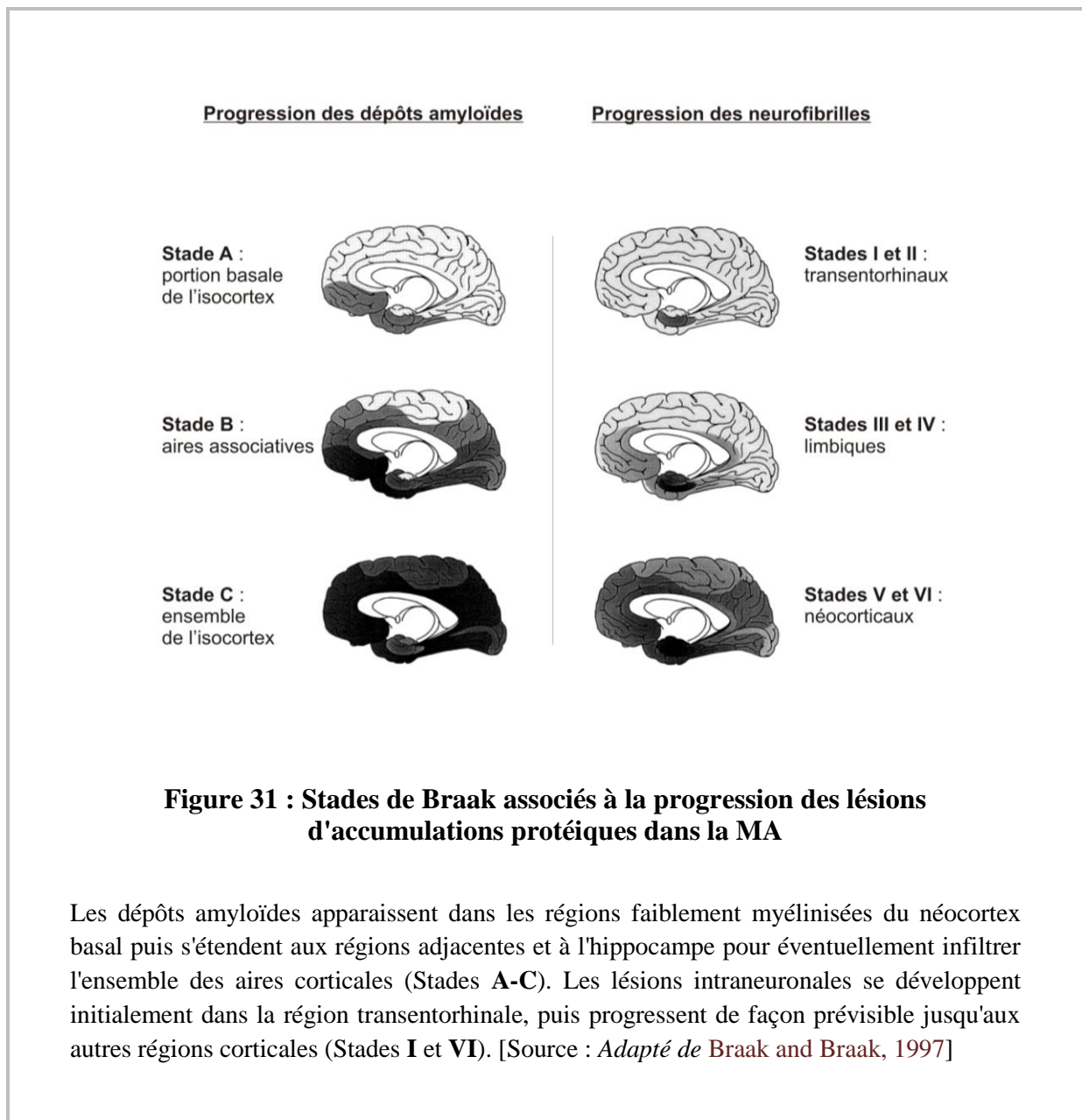
Les accumulations protéiques précèdent l'apparition des symptômes. Une fois ces processus enclenchés, ils progressent de façon immuable sans qu'aucune rémission ne soit possible. La déposition d'A β débute dans le néocortex tandis que l'accumulation de neurofibrilles est initiée dans la région transentorhinale (**Figure 31**). Les dépôts protéiques vont ensuite progresser et se propager à d'autres régions corticales en suivant une séquence stéréotypée provoquant une lente progression des symptômes cliniques.

Au cours des années 90, les époux Braak ont récolté des données sur plus de 2 600 cerveaux humains. Ils ont établi une classification des différentes étapes de la pathologie en fonction de la progression des lésions respectivement liées aux protéines Tau et A β (Thal and Braak, 2005). Cette classification associe chaque période à un stade qui reflète la gravité de la pathologie. Les stades A à C représentent l'évolution des dépôts amyloïdes tandis que les stades I à VI marquent l'évolution des lésions neurofibrillaires intraneurales (**Figure 31**). Aux stades III et IV, une sévère destruction du cortex est déjà observable bien qu'elle soit restreinte aux régions entorhinales et adjacentes. Ce stade correspond à l'apparition des premiers symptômes cliniques tandis que les stades V et VI correspondent à un niveau avancé de la MA (Braak and Braak, 1997).

3. Recherche de la pathogenèse de la MA

Basée sur les signes anatomopathologiques, l'hypothèse la plus communément admise concernant la pathogenèse de la MA est celle de la cascade amyloïde (Hardy et al., 2014 ; Querfurth and LaFerla, 2010 ; Spires-Jones and Hyman, 2014 pour revue). Cette hypothèse stipule que le clivage anormal du précurseur de la protéine amyloïde, l'APP⁷⁴, est l'événement clef dans le développement de la maladie. Il conduirait à la surproduction de fragments plus longs (principalement A β ₄₀ et A β ₄₂), s'associant entre eux pour former des oligomères qui, s'ils ne sont pas correctement éliminés par l'organisme (Karamanos et al., 2015), s'agrègeront en plaques macroscopiques dans le milieu extracellulaire (**Figure 32**) (Mattson, 2002).

⁷⁴ APP : Amyloid Precursor Protein



L'hypothèse de la cascade amyloïde a été fortement renforcée par le fait que les formes familiales de la MA sont liées à des mutations dans les gènes codant pour l'APP ou les enzymes impliquées dans le clivage de l'APP comme les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) (**Figure**) (Schellenberg and Montine, 2012 ; Tanzi et al., 1996). En outre, l'étude du niveau d'A β et de protéine Tau contenu dans le LCS⁷⁵ de patients révèle que le métabolisme anormal d'A β précède la pathologie associée à Tau et la dégénérescence neuronale qui en découle

⁷⁵ LCS : Liquide CérébroSpinal

(Buchhave et al., 2012) bien que la relation de cause à effet entre ces deux anomalies ne soit pas claire.

Ainsi, un très grand nombre d'études a été mené sur l'hypothèse amyloïde (Hardy et al., 2014 ; Hardy and Higgins, 1992 ; Selkoe, 1991) et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Arriagada et al., 1992 ; Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Ihara et al., 1986 ; Patrick et al., 1999) et a servi de base au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Barage and Sonawane, 2015 ; Hardy and Selkoe, 2002 ; Lane et al., 2012 ; Salomone et al., 2012). Cependant, jusqu'à présent, les immunothérapies capables de réduire significativement les plaques n'ont pas empêché la progression de la maladie (Holmes et al., 2008). La plupart des essais cliniques ciblant l'élimination des dépôts A β a peu amélioré les fonctions cognitives des patients (Gravitz, 2011 ; Holmes et al., 2008). Les traitements basés sur la pathologie associée à Tau ne se sont pas avérés plus efficaces (Gozes, 2010 ; Medina, 2011 ; Pritchard et al., 2011). Cela est très certainement dû à une prise en charge trop tardive des patients à un stade où les dommages sont déjà irréversibles.

Ceci pousse à reconsidérer les hypothèses sur la pathogenèse de la MA (Skaper, 2012 ; Teich and Arancio, 2012). Un nombre croissant d'indices indique que les mécanismes responsables de la pathogenèse de la MA et de sa progression sont hétérogènes et multifactoriels, spécifiquement dans le cas des formes sporadiques de la MA (Herrup, 2015). Comprendre ces mécanismes pourrait permettre un diagnostic plus précoce de la pathologie et fournir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans cette optique, les avancées technologiques de la neuro-imagerie ont permis d'explorer les relations entre le métabolisme énergétique, le début de la MA et sa progression. Elles ont conduit à l'établissement de nouveaux biomarqueurs fiables afin d'établir un diagnostic plus précoce de la MA.

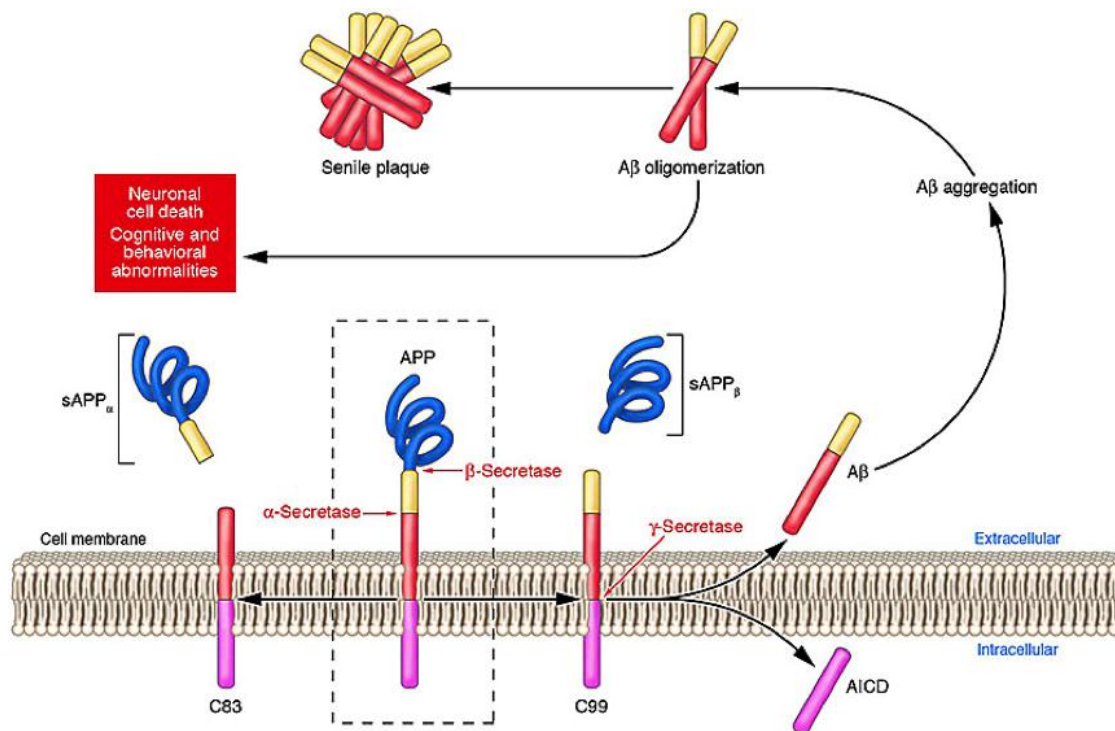


Figure 32 : Le clivage anormal de l'APP conduit à la production du peptide amyloïde

La protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est normalement clivée par une protéase extracellulaire appelée l' α -sécrétase. Ce clivage libère un fragment extracellulaire soluble ($sAPP_{\alpha}$). Un second clivage est réalisé au sein de la membrane par un complexe protéique appelé γ -sécrétase. La sous-unité catalytique de cette sécrétase est une préséniline, codée par le gène *PSEN1* ou *PSEN2*. Ce second clivage libère un peptide intracellulaire (AICD) en plus du peptide résiduel compris entre les coupures des α - et γ -sécrétases (en rouge, à gauche). Si le clivage extracellulaire est réalisé par une β -sécrétase, il produira un plus petit fragment extracellulaire : $sAPP_{\beta}$. Le second clivage par la γ -sécrétase libèrera un fragment extracellulaire plus long (40 à 42 acides aminés) : le peptide amyloïde β ($A\beta$). Ce fragment s'agrègera sous forme d'oligomère puis de plaques macroscopiques caractéristiques de la MA. [Source : Lublin and Gandy, 2010]

B. Etude de la MA grâce aux techniques d'imagerie cérébrale

1. Outils d'imagerie cérébrale utilisés dans le contexte de la MA

a. Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

En fournissant des images anatomiques du cerveau (**Figure**), l'IRM⁷⁶ permet d'évaluer les changements structuraux intervenant dans les processus neurodégénératifs comme la MA.

L'IRMf permet de visualiser l'activité cérébrale de manière indirecte, grâce à l'enregistrement des variations hémodynamiques. La localisation des régions cérébrales activées est basée sur l'effet BOLD⁷⁷ (Ogawa et al., 1990 ; Schridde et al., 2008 ; Smirnakis et al., 2007), lié aux propriétés magnétiques de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges du sang. En effet, l'oxyhémoglobine (diamagnétique) et la déoxyhémoglobine, (paramagnétique) se comportent différemment dans un champ magnétique. Lorsqu'un individu est soumis à un champ magnétique, la modification de l'oxygénation du sang va induire des inhomogénéités de champ magnétique qui sont détectées par l'appareil IRM.

b. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La sRMN⁷⁸ est également basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire. Elle repose sur la propriété que possèdent les noyaux de certains atomes (comme le carbone 13 ou l'hydrogène 1) d'émettre des signaux détectables quand ils sont placés dans un champ magnétique puissant et soumis à une impulsion de radiofréquence particulière, capable de le faire résonner. Cette technique permet d'évaluer la teneur en métabolites cérébraux (**Figure 33**).

La spectroscopie RMN a notamment été utilisée pour détecter la résonance du 2DG ou le 2DG6P marqué au carbone 13 et estimer les flux métaboliques *in vivo* (Cohen et al., 2002 ; Pan et al., 2001 ; Shulman, 2004). Cependant, la faible sensibilité de cette technique limite

⁷⁶ IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

⁷⁷ BOLD : *Blood Oxygen Level Dependant*

⁷⁸ sRMN : spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

son application (Zu et al., 2014), seuls les métabolites présents en concentration suffisamment grande pourront être détectés par les scanners.

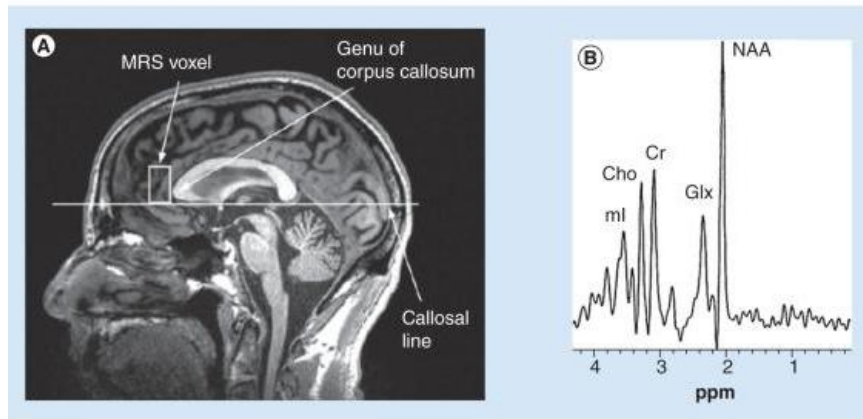


Figure 33 : Etude de marqueurs de l'intégrité cellulaire et du métabolisme par spectroscopie RMN du proton ^1H

A. Localisation du placement des voxels pour l'étude par spectroscopie RMN sur une IRM cérébrale parasagittale. **B.** Spectre des protons observables en spectroscopie RMN. *N-acetyl aspartate* [NAA] : marqueurs de l'intégrité neuronale ; myo-Inositol [mI] : marqueurs de l'intégrité gliale ; Créatine [Cr] : produits du métabolisme énergétique ; Glutamate et glutamine [Glx] et Choline [Cho] : transmission synaptique ; ppm : partie par million. [Source : Lin and Rothman, 2014]

c. Imagerie du tenseur de diffusion

Basée sur la technique de RMN, la DIT⁷⁹ exploite la diffusion des protons contenus dans les molécules d'eau pour générer des images par contraste (Jonckers et al., 2015). Le coefficient de diffusion dépend des contraintes exercées sur les molécules d'eau (Nicholson and Syková, 1998), il varie donc selon la structure de l'espace extracellulaire des différents

⁷⁹ DIT : *Diffusion Imaging Tensor*

tissus. Cette technique permet de cartographier les fibres de la substance blanche *in vivo*. Elle est également utilisée pour évaluer les lésions axonales et les démyélinisations.

Ainsi, les outils d'imagerie IRM sont largement utilisés pour évaluer les structures et les fonctions cérébrales et la distribution des métabolites. Ils apportent des informations physiologiques sur la circulation du LCS, le volume et le débit sanguin cérébral ou encore la perfusion des tissus étudiés (Denic et al., 2011). L'avantage majeur est que ces techniques sont non invasives et ne nécessitent pas de ligand radioactif (contrairement à la TEP).

d. TEP

Avant que l'imagerie RMN ne se répande, la TEP était la méthode la plus utilisée pour mesurer les différents aspects de la physiologie des fonctions cérébrales *in vivo* (Fox and Raichle, 2007 ; Phelps, 2000). Aujourd'hui, elle est essentiellement utilisée pour diagnostiquer les tumeurs, les ischémies et les démences.

La TEP mesure les émissions d'un composé radiomarqué métaboliquement actif qui a été préalablement injecté dans la circulation sanguine ou inhalé. Les radio-isotopes émetteurs de positrons sont généralement produits par un cyclotron ; les composés chimiques d'intérêt sont ensuite marqués avec ces atomes radioactifs. Le composé marqué, appelé radiotracer, est injecté dans la circulation sanguine où il va gagner le cerveau. En se désintégrant dans le tissu, le composé radioactif va émettre des positrons qui vont immédiatement se combiner à des électrons d'atomes alentour. Ils vont s'annihiler en produisant deux photons γ à haute énergie qui seront émis dans des directions opposées. Une caméra va détecter les coïncidences des photons γ émis (**Figure 34**). Ainsi, les scanners détectent la radioactivité de l'agent qui se décompose. Le traitement informatique des données d'émission permet ensuite la reconstitution d'une image tridimensionnelle de la distribution du radiotracer dans le cerveau.

En fonction du traceur radioactif utilisé, cette technique permet de visualiser la synthèse de protéines, la distribution de récepteurs, les flux cérébraux sanguins ou encore l'utilisation du glucose et de l'oxygène. L'oxygène-15, le fluor-18 et le carbone-11 sont les radiotraceurs les

plus communs. Ces isotopes peuvent être intégrés dans diverses molécules organiques comme les molécules d'eau, le dioxygène, le glucose ou même des agonistes et antagonistes de récepteurs cérébraux. Une large gamme de ligands est utilisée pour cartographier différents aspects de l'activité neuronale.

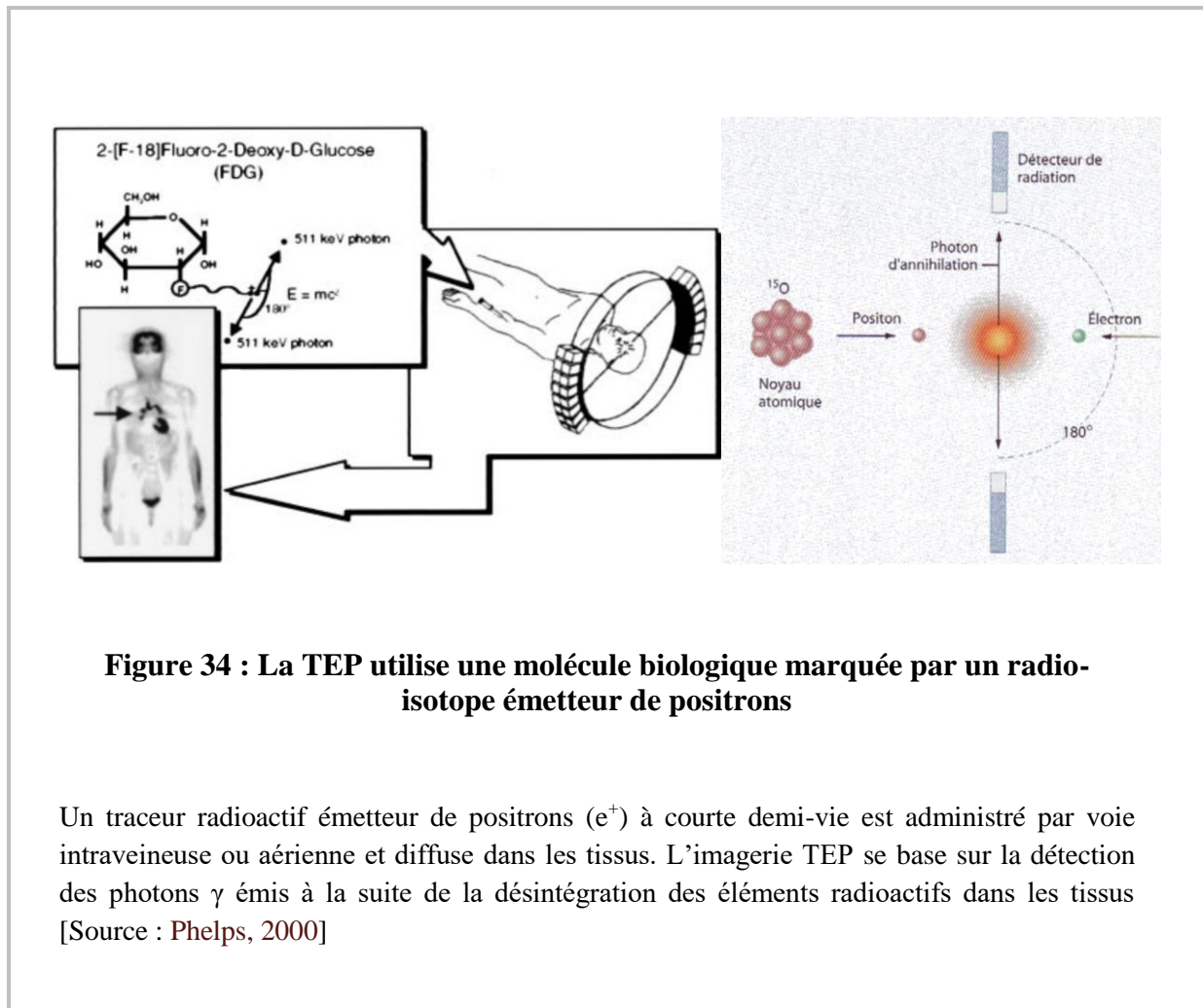


Figure 34 : La TEP utilise une molécule biologique marquée par un radio-isotope émetteur de positrons

Un traceur radioactif émetteur de positrons (e^+) à courte demi-vie est administré par voie intraveineuse ou aérienne et diffuse dans les tissus. L'imagerie TEP se base sur la détection des photons γ émis à la suite de la désintégration des éléments radioactifs dans les tissus [Source : Phelps, 2000]

Historiquement, le glucose marqué au carbone 14 a été le premier radioligand employé pour étudier le métabolisme du glucose chez le rat. La rétention du composé était alors déterminée par autoradiographie *ex vivo* (Sokoloff et al., 1977). Aujourd'hui, le glucose marqué au Fluor 18, le FDG⁸⁰ est de loin l'isoforme la plus utilisée pour l'étude *in vivo* du métabolisme du glucose (Reivich et al., 1979). Elle permet d'évaluer à la fois le transport du glucose et sa phosphorylation consécutive lors de la glycolyse (Phelps et al., 1979) (cf. partie 1, I.A.1. et

⁸⁰ FDG : [¹⁸F]-FluoroDeoxyGlucose

I.B.1.) Le 18F-FDG a été amplement usité pour étudier les fonctions cellulaires et l'activité métabolique, particulièrement pour le diagnostic et l'évaluation des cancers (Gambhir, 2002) et des maladies neurodégénératives comme la MA (Nordberg et al., 2010). Le PiB⁸¹ est également un radioligand très largement employé pour évaluer la charge amyloïde dans le cerveau (Klunk et al., 2004 ; Sperling et al., 2009). L'utilisation combinée du FDG et du PiB est une des approches les plus courantes pour mesurer à la fois l'énergie métabolique cérébrale (Leon et al., 1983 ; Minoshima et al., 1997 ; Small et al., 1995b) et la pathologie amyloïde (Bacskai et al., 2003 ; Jack et al., 2008 ; Klunk et al., 2004) dans le cadre de la MA.

Si les résolutions spatiales se valent entre l'IRM, la TEP (de l'ordre du millimètre), la résolution temporelle de l'IRMf (de l'ordre de la seconde) reste meilleure. En effet, la TEP dépend de la demi-vie du marqueur radioactif utilisé (O¹⁵ 120 secondes, C¹¹ 20 minutes et F¹⁸ 120 minutes) et la décroissance rapide de la radioactivité limite la durée d'utilisation de cette technique à des études courtes.

2. Biomarqueurs utilisés pour l'étude de la MA par imagerie fonctionnelle

Les biomarqueurs sont des indicateurs mesurables qui aident à évaluer la progression de la MA et son diagnostic. Le processus physiopathologique démarrant bien avant les premiers symptômes cliniques, s'aider de biomarqueurs offre à la fois l'opportunité de diagnostiquer précocement la pathologie, de prédire la transition MCI à MA ainsi que la progression de la MA (Bateman et al., 2012). L'amélioration des modalités d'imagerie ont permis de rechercher des biomarqueurs de plus en plus variés pour la MA.

a. Dépôts amyloïdes et protéines Tau hyperphosphorylées

Dans la MA, l'imagerie fonctionnelle par TEP a été largement utilisée pour examiner les dysfonctions neuronales et les dépôts amyloïdes (Albert et al., 2011).

TEP et quantification des plaques amyloïdes

⁸¹ PiB : [¹¹C]-Pittsburgh compound-B

L'hypothèse de la cascade amyloïde a motivé le développement de radiotraceurs capables de se lier aux plaques amyloïdes et d'imager, par-là, la charge amyloïde cérébrale.

En 2004, Klunk et son équipe ont démontré l'affinité d'un radioligand pour les plaques amyloïdes. Développé à l'université de Pittsburgh (Klunk et al., 2004), le PiB est un dérivé de la thioflavine-S marquée au carbone 11 qui possède une affinité de l'ordre du nanomolaire pour les espèces fibrillaires de l'amyloïde. Il a permis aux chercheurs et aux cliniciens de suivre *in vivo* l'évolution de la charge amyloïde chez les patients (Sperling et al., 2009 ; Villemagne et al., 2013). De nouveaux traceurs ont été développés ces dernières années ; basés sur l'isotope 18 du fluor, leur demi-vie est au moins deux fois plus longue que les espèces dérivées du carbone 11 (Barthel et al., 2011 ; Fleisher et al., 2011 ; Villemagne et al., 2012).

La présence de dépôts amyloïdes n'est pas spécifique des sujets atteints de la MA ; les personnes saines, d'âge moyen, peuvent présenter une rétention du PiB qui augmente avec le vieillissement naturel (De Meyer et al., 2010). Chez les patients atteints de la MA en revanche, la rétention du PiB est plus importante (**Figures 35 et 37**) et augmente fortement avec la progression de la maladie (Del Sole et al., 2016 ; Forsberg et al., 2008 ; Okello et al., 2009 ; Wolk et al., 2009). Une étude menée sur plus de 200 sujets a quantifié un niveau de rétention de 31% chez les sujets sains contre 69% chez les patients MCI et 97% chez les individus atteints de démence au même âge (Villemagne et al., 2011).

L'accumulation de dépôts débute plusieurs années voir des décennies avant l'apparition des premiers symptômes (Bourgeat et al., 2010 ; Jansen et al., 2015 ; Mintun et al., 2006 ; Scheinin et al., 2009). Dans les formes familiales de la pathologie, l'A β commence à s'accumuler environ 16 ans avant le début du MCI et 21 ans avant la MA confirmée par autopsie (Fleisher et al., 2012).

Bien que les dépôts amyloïdes soient corrélés avec le déclin cognitif, il est important de noter que certains individus développent un MCI sans charge amyloïde. La rapidité avec laquelle ils développeront une démence est alors moins importante que les individus MCI avec charge amyloïde (Jack et al., 2010). A l'inverse, certaines personnes âgées sans déficits cognitifs présentent des dépôts significatifs (Aizenstein et al., 2008) ; cependant, rien n'indique qu'elles ne vont pas développer la MA dans les années qui suivront l'étude.

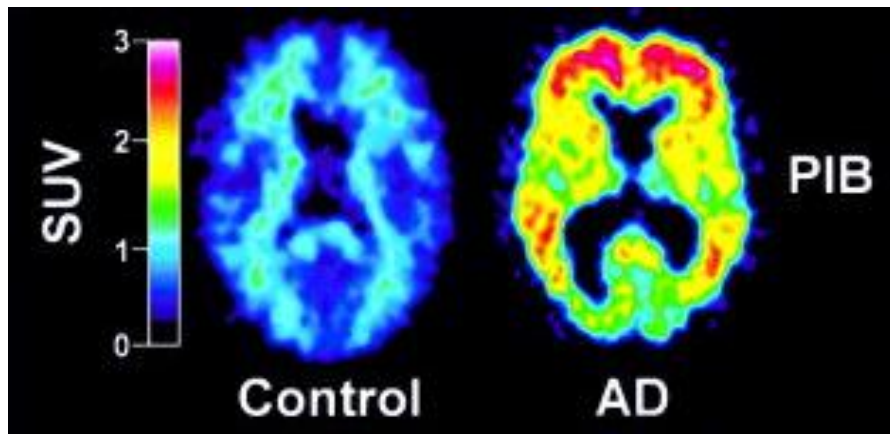


Figure 35 : Quantification des plaques amyloïdes cérébrales par imagerie PiB-TEP d'un sujet contrôlé et d'un sujet atteint de la MA

Images des valeurs standardisées de la rétention du PiB (SUV^{82}) révélant une différence de rétention marquée entre le patient MA et le sujet contrôlé. Chez le patient, le cortex frontal et le cortex temporopariétal sont particulièrement marqués, ce qui traduit une forte charge amyloïde dans ces régions cérébrales. [Source : Klunk et al., 2004]

Ainsi, la détection d'A β cérébral ne permet pas d'établir un diagnostic définitif de la MA. Elle confirme une amyloïdose du cerveau qui peut conduire au développement de la MA ou d'une autre forme de démence.

⁸² SUV : *Standardized Uptake Value*

TEP et quantification de la protéine Tau

Si le PiB se lie aux fibrilles amyloïdes avec une grande affinité, il n'en est pas de même pour les NFT (Maruyama et al., 2013). Des radioligands ont donc été développés ces dernières années (Chien et al., 2014 ; Fodero-Tavoletti et al., 2011 ; Hostetler et al., 2016) afin de suivre la progression de la déposition neuronale de la protéine Tau. L'accumulation de Tau mesurée par le ^{11}C -PBB3 dans la région médio-temporale est corrélée avec l'atrophie corticale. Cela conforte l'hypothèse d'une toxicité directe des agrégats sur les neurones (Maruyama et al., 2013).

Dans le but d'acquérir de nouvelles connaissances sur les processus toxicologiques intervenants lorsque Tau et A β interagissent, l'accumulation des fibrilles de protéine Tau formant les NFT est de plus en plus étudiée en complément de l'imagerie d'A β (Gordon et al., 2016 ; Sperling et al., 2011).

Ainsi, l'imagerie TEP permet de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques complexes sous-tendus dans la MA et sert à évaluer l'efficacité d'un traitement lors des immunothérapies anti-amyloïdes (Nordberg et al., 2010).

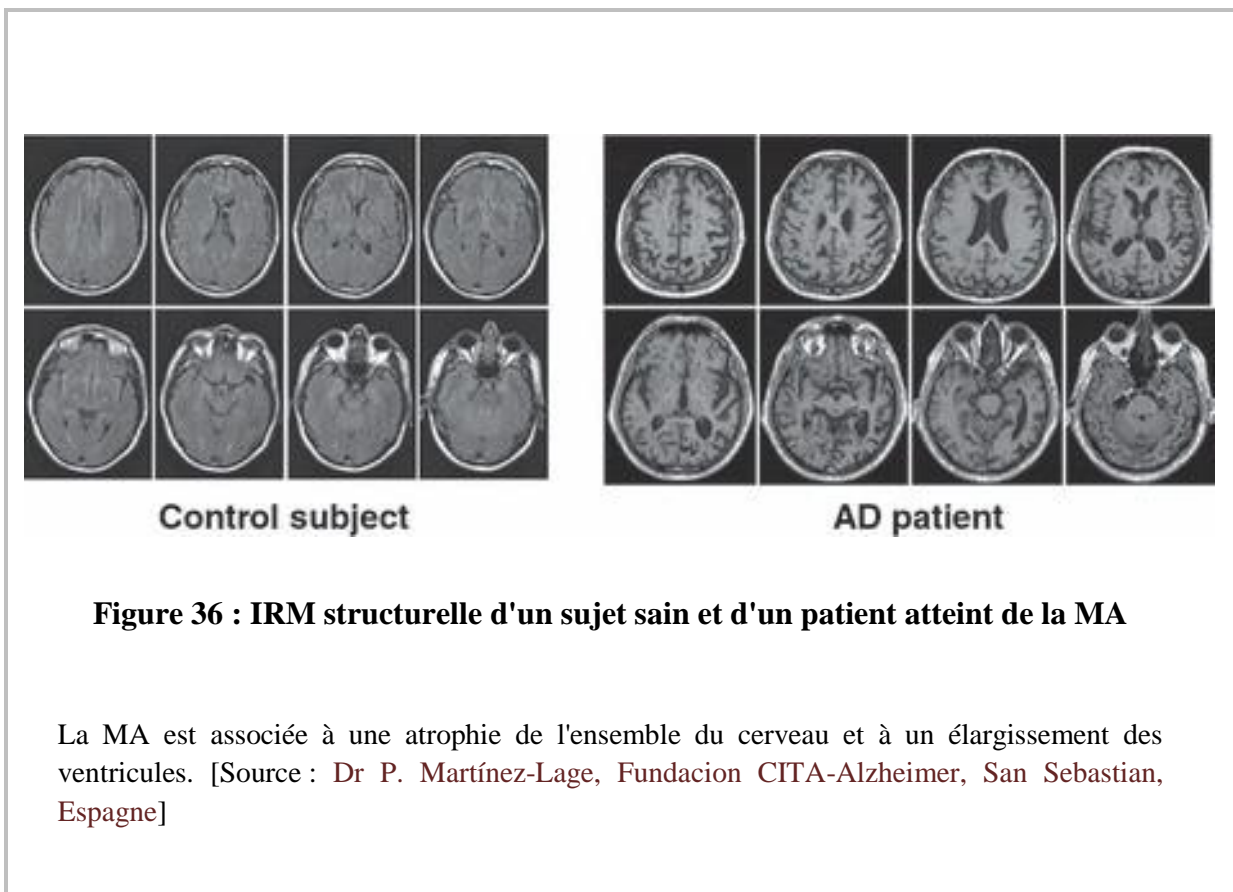
b. Réduction du volume cérébral

Si l'imagerie TEP de Tau et A β génère un grand intérêt pour la communauté scientifique, des études d'IRM, menées par Walhovd et son équipe, montrent que de simples données morphométriques de l'hippocampe s'avèrent plus sensibles pour le diagnostic de la MA (Walhovd et al., 2010).

L'atrophie corticale mise en évidence par IRM chez les patients de la MA (**Figure 36**) est associée au stade NFT de la pathologie. Son évolution progressive corrèle avec la sévérité de la maladie et avec la neurodégénérescence confirmée par histologie *post mortem* (Dickerson et al., 2012 ; Frisoni et al., 2009). Dans les premiers stades de la pathologie, chez les patients présentant des troubles de la mémoire, l'atrophie se limite à l'hippocampe, au cortex cingulaire postérieur et au cortex orbitofrontal. Avec la progression, des déficits cognitifs comme le

langage, les fonctions spatiales, visuelles et exécutives, l'atrophie s'étend aux régions néocorticales temporales, pariétales et frontales.

L'atrophie générale du cerveau d'un patient atteint de la MA est en général deux fois plus importante que celui d'une personne âgée saine et les formes familiales de la MA sont plus sévèrement touchées que les formes sporadiques (Seo et al., 2011). Les études menées sur des jeunes adultes présentant des prédispositions génétiques pour la MA (porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (APOE) ou de la mutation E280A de la préséniline 1) révèlent que des anomalies d'IRM (structurelles et fonctionnelles) apparaissent des années avant le déclin cognitif et même avant la déposition amyloïde mesurée par TEP (Reiman et al., 2012).



Actuellement, l'atrophie de l'hippocampe est utilisée comme un marqueur de progression de la pathologie. La littérature rapporte une réduction de 10% à 15% du volume de l'hippocampe chez les MCI par rapport aux sujets sains du même âge (Shi et al., 2009) et une réduction de 15% à 40% chez les patients de la MA (Pantel et al., 1998). Au niveau de l'hippocampe, la

région CA1⁸³ est particulièrement affectée (Boutet et al., 2014) or, c'est à ce niveau que les NFT se manifestent en premier lieu avant de se répandre dans l'intégralité de l'hippocampe.

Ainsi, la morphométrie par IRM est un outil utile pour passer au crible les sujets à risque. Elle est considérée comme un biomarqueur des lésions neuronales chez les patients de la MA et les MCI mais n'a pas de rôle dans la définition préclinique de la pathologie (Albert et al., 2011 ; Dubois et al., 2016a).

c. Altération de la connectivité structurelle et anatomique

Une diffusivité accrue traduisant des changements structurels de la substance blanche a été mise en évidence par DIT. Elle est particulièrement marquée dans les lobes temporaux et frontaux, le corps calleux et le cortex cingulaire postérieur entre autres (Sexton et al., 2011). La désorganisation topologique de la connectivité des réseaux dans la substance blanche (Lo et al., 2010) serait associée à la réduction des capacités cognitives chez les patients de la MA.

En plus d'une altération de la connectivité anatomique, l'IRMf a révélé des troubles de la connectivité fonctionnelle. Les travaux de Sheline et al. ont révélé que l'activité cérébrale du "*Default Mode Network*", un réseau activé à l'état de repos et démobilisé lors de tâches cognitives, est perturbée chez les patients de la MA, comparée à celle des sujets sains du même âge. Cette connectivité anormale est exacerbée chez les individus génétiquement prédisposés et pourrait précéder, dans le temps, l'accumulation amyloïde (Sheline et al., 2010).

⁸³ CA1 : *Cornu Ammonis* sector 1

d. Métabolites cérébraux et RMN

Dans le cadre de la MA, les variations régionales de certains métabolites cérébraux ont été étudiées par RMN. Le NAA⁸⁴, par exemple, est un métabolite couramment employé pour évaluer la viabilité neuronale étant donné qu'il diminue nettement en cas de maladie cérébrale (Connelly et al., 1994 ; Graham et al., 1993 ; Kwo-On-Yuen et al., 1994) et qu'il n'est pas détecté dans la glie mature (Urenjak et al., 1993).

Une méta-analyse récente conduite sur des patients atteints de la MA rapporte que le NAA est réduit significativement au niveau de l'hippocampe et du cortex cingulaire postérieur. Les auteurs suggèrent que ce métabolite serve de biomarqueur des dysfonctions neuronales dans les démences neurodégénératives (Wang et al., 2015).

Un grand nombre d'autres biomarqueurs ne nécessitant pas l'intervention de dispositifs d'imagerie a été recherché dans le cadre de la MA. La mesure d'une baisse du niveau d'A β (Craig-Schapiro et al., 2010) ou d'une accumulation de protéine tau (Albert et al., 2011) dans le LCS, la concentration plasmatique en certains lipides (Mapstone et al., 2014) ou les changements d'amplitudes mesurés en EEG⁸⁵ (Al-Nuaimi et al., 2016) peuvent être cités à titre d'exemple. Ils ne seront pas présentés ici (pour revue voir Hane et al., 2017).

L'imagerie TEP est actuellement la technique la plus prédictive pour la progression de la MA. Associée à la rétention du PiB, le suivi de la consommation du glucose cérébral s'avère être le biomarqueur le plus utilisé pour évaluer la maladie (**Figure 37**) (Hane et al., 2017).

⁸⁴ NAA : N-Acétyl-Aspartate

⁸⁵ EEG : ElectroEncéphaloGramme

3. Hypométabolisme du glucose, biomarqueur précoce de la MA

Les changements des taux d'utilisation du glucose, détectés par TEP, sont étudiés depuis des décennies pour évaluer indirectement l'activité neuronale et synaptique (Fox et al., 1988 ; Fox and Raichle, 1986). Comme le métabolisme du glucose et l'activité neuronale sont étroitement liés (**voir I.B**), le FDG est une sonde de choix pour analyser la neurodégénérescence dans le cadre de la MA.

a. FDG et réductions locales du métabolisme cérébral chez les patients de la MA

Comparé à des individus sains du même âge, les patients atteints de la MA présentent des altérations régionalisées du métabolisme du glucose (**Figure 37**). Les études par FDG-TEP ont démontré une réduction constante et progressive du flux métabolique chez les patients Alzheimer dont l'ampleur et la topographie sont corrélées avec la sévérité des symptômes (Mosconi, 2005).

L'hypométabolisme concernerait initialement le système limbique (hippocampe, amygdale, gyrus, cortex entorhinal) associé aux processus de mémorisation (Mosconi, 2005). Il s'étendrait ensuite au cortex pariétal, temporal et cingulaire postérieur avant d'atteindre les aires associatives du cortex préfrontal et le lobe frontal dans les stades de MA les plus avancés (Friedland et al., 1983 ; Minoshima et al., 1997). Certaines régions, comme le cortex moteur primaire, le cortex visuel, le cervelet, le thalamus et les ganglions de la base, sont plus épargnées (Mosconi, 2005), ce qui pourrait indiquer un processus de progression spécifique au niveau de régions plus vulnérables.

L'hypométabolisme estimé par FDG-TEP reflète la distribution régionale de la réduction de l'activité synaptique et la perte de densité synaptique chez les patients atteints de la MA (Pappatà et al., 2008 ; Rinne et al., 2003) et corrèle donc bien avec les altérations cognitives dues à la neurodégénérescence (Silverman et al., 2001).

De plus, des études indiquent que la cartographie de la rétention du glucose obtenue par FDG-TEP est suffisamment spécifique pour permettre de différencier une MA d'une autre forme de

démence (Albin et al., 1996 ; Shivamurthy et al., 2015 ; Silverman et al., 2001). Par exemple, une réduction du métabolisme du glucose dans le cortex occipital primaire sera spécifique des démences avec corps de Lewis (Albin et al., 1996 ; Hoffman et al., 2000).

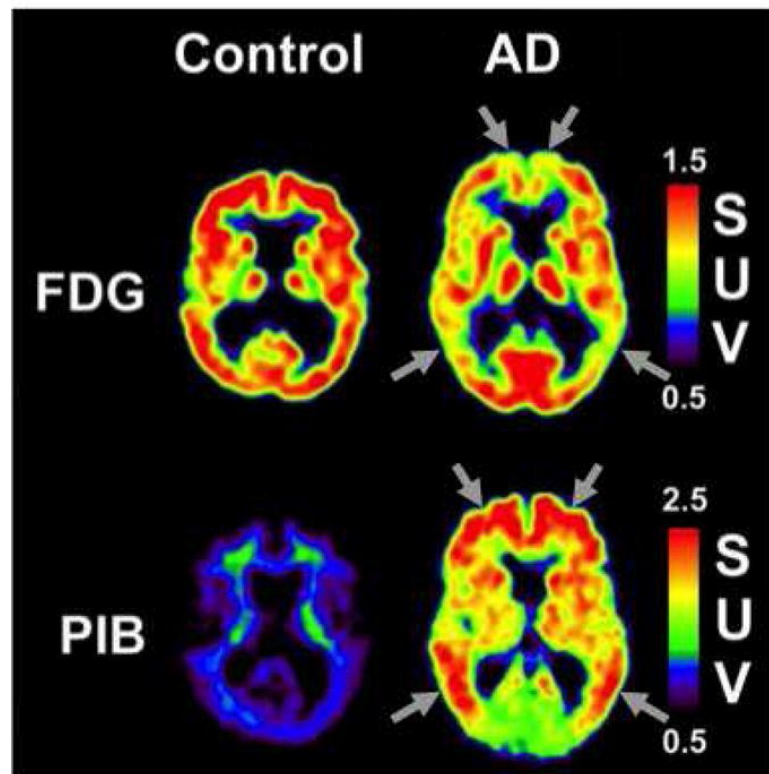


Figure 37 : FDG-TDP et PiB-TDP d'un sujet contrôle et d'un sujet atteint de MA

La FDG-TDP révèle une diminution du métabolisme du glucose particulièrement marqué au niveau du cortex temporopariétal ainsi qu'au niveau du cortex frontal chez le patient MA. L'importante rétention du PiB dans ces mêmes régions cérébrales traduit une forte charge amyloïde. Les flèches blanches indiquent les régions principalement touchées par l'hypométabolisme du glucose et l'accumulation de dépôts amyloïdes respectivement. [Source : Cohen and Klunk, 2014]

b. FDG et hypométabolisme précoce du glucose

L'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (APOE⁸⁶) est un facteur de risque pour les formes sporadiques de la MA (**Figure 38**). Il y a une vingtaine d'années, Roses et son équipe ont travaillé avec 20 personnes saines, d'âge moyen et portant les allèles APOE $\epsilon 4$. L'étude révèle que si les capacités de mémorisation n'étaient pas altérées chez ces personnes, leur CMRglu⁸⁷ était significativement diminué. Les régions sensibles au développement de la MA, (i.e. cortex cingulaire postérieur, cortex temporal et cortex préfrontal), étant particulièrement concernées par cette réduction du métabolisme du glucose (Reiman et al., 1996 ; Small et al., 1995b).

Une dizaine d'années plus tard, Mosconi et ses collègues ont suivi des sujets âgés homozygotes pour l'allèle APOE $\epsilon 4$ qui présentaient des fonctions cognitives normales. Ils ont remarqué que l'on pouvait prédire le risque pour ces sujets de développer la MA, en évaluant leur métabolisme du glucose cérébral par FDG-TEP (Mosconi et al., 2004 ; Mosconi, 2005). Chez ces individus, la réduction du métabolisme cérébral apparaissait plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. De la même façon, les porteurs du gène muté de la préséniline-1 (PS1) présentent une réduction significative du métabolisme du glucose cérébral en moyenne 13 ans avant l'âge estimé de développement de la maladie (Mosconi et al., 2006, 2008, 2009). Ainsi, la combinaison des risques génétiques (**Figure 38**) et du déclin du CMRglu sont utiles à la prédiction et au diagnostic de la MA.

c. FDG et réductions locales du métabolisme cérébral dans les cas de MCI

Comme décrit plus haut, certains changements fonctionnels comme l'hypométabolisme du lobe temporo-médian (Mosconi et al., 2006, 2009) peuvent être détectés avant l'apparition des manifestations cliniques de la MA. Cependant, l'apparition insidieuse et les altérations progressives de la mémoire et des autres fonctions cognitives

⁸⁶ APOE : APolipoprotéine E

⁸⁷ CMRglu : *Cerebral Metabolic Rate of glucose*

rendent difficile la distinction entre développement de la MA et vieillissement normal (McKhann et al., 1984). Chez les sujets sains âgés, effectivement, la FDG-TEP révèle également une réduction diffuse et progressive de la consommation régionale du glucose, associée parfois à une atrophie cérébrale (Kakimoto et al., 2016).

Par le biais des études cliniques, les chercheurs se sont donc intéressés au MCI⁸⁸ qui correspond à un stade prodromique pendant lequel des symptômes avant-coureurs, généralement bénins, annoncent la survenue de la phase principale de la MA (DeCarli, 2003 ; Hatashita and Yamasaki, 2010 ; Petersen et al., 2001 ; Ringman et al., 2009). Le MCI est proposé comme un stade de transition, entre le vieillissement normal et la démence, pendant lequel les individus ont la capacité de réaliser des tâches et d'avoir une activité journalière normale malgré la présence de problèmes mnésiques liés au vieillissement (DeCarli, 2003 ; Hatashita and Yamasaki, 2010 ; Ringman et al., 2009).

De nombreuses études ont mis en lumière que les patients MCI ont un risque plus élevé de développer la MA, avec une conversion estimée à 10-15% par an (Petersen et al., 2001). La combinaison de l'imagerie RMN et des études en FDG-TEP ont prouvé que l'hypométabolisme du lobe temporo-pariétal était un marqueur fiable et spécifique pour l'identification des MCI (Mosconi et al., 2005) et que la région de l'hippocampe était également touchée (Jauhiainen et al., 2008 ; Mosconi et al., 2005).

Les études longitudinales servent à évaluer la progression topographique de l'hypométabolisme cérébral. Ces études révèlent que l'hypométabolisme toucherait initialement les régions associées à la mémoire (hippocampe, cortex entorhinal) puis progresserait vers les régions néocorticales supérieures comme le cortex pariétal et temporal pour finalement atteindre le cortex frontal (Jauhiainen et al., 2008 ; Mosconi et al., 2005). Ceci pourrait refléter différentes susceptibilités des régions cérébrales à l'hypométabolisme.

Le pouvoir prédictif du FDG-TEP sur la rapidité de progression de la démence a été évalué avec une sensibilité de 70% à 93% et une spécificité de 47% à 89% (Herholz, 2010 ; Li et al., 2008). L'hypométabolisme du glucose dans le cortex temporo-pariétal et cingulaire postérieur est un biomarqueur relativement fiable du diagnostic prodromique de la MA chez les patients

⁸⁸ MCI : *Mild Cognitive Impairment*

MCI (Herholz, 2010). Les données d'une récente analyse longitudinale de l'ADNI⁸⁹ ont abouti à la proposition d'une nouvelle méthode de diagnostic associant un test FDG-TEP à un test mnésique pour prédire la conversion de MCI en MA (Landau et al., 2010). Enfin, le critère récemment publié de IWG-2 suggère que le déclin du métabolisme du glucose cérébral (détecté par TEP) et les mesures IRM de l'atrophie cérébrale reflètent le décours temporel de l'évolution de la pathologie dans la MA (Dubois et al., 2016b).

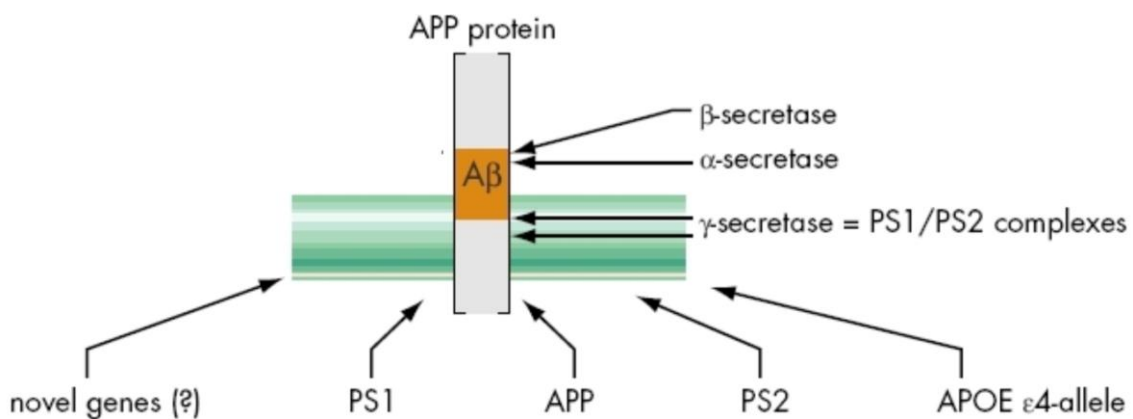


Figure 38 : Prédilection génétique à la maladie d'Alzheimer

Plusieurs facteurs génétiques de susceptibilité ont été identifiés pour la MA. Les mutations de l'**APP** (*Amyloid Precursor Protein*), précurseur du peptide Aβ ou des enzymes impliquées dans le clivage de l'APP comme les présénilines 1 et 2 (**PS1** et **PS2**) sont à l'origine de MA familiale autosomique dominante (Schellenberg and Montine, 2012 ; Tanzi et al., 1996). L'**allèle ε4** du gène **APOE**, codant pour l'apolipoprotéine E, quant à lui, est impliqué dans au moins 20% des cas de MA (Farrer et al., 1997 ; Rao et al., 1996). Récemment, un lien significatif a été établi entre la MA tardive (qui apparaît après 65 ans) et 19 régions du génome (*novel genes*), [Source : Lambert et al., 2013]

⁸⁹ ADNI : Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative

L'association de l'imagerie TEP du PiB et du FDG est un des index fonctionnels les plus fiables pour suivre la progression de la pathologie AD (Nordberg et al., 2010 ; Weiner et al., 2010). Des études menées chez de jeunes adultes sains ont établi que les régions corticales présentant une oxydation incomplète du glucose corrélaient avec la localisation des dépôts amyloïdes et les altérations du DMN chez les patients de la MA (Sperling et al., 2009 ; Vlassenko et al., 2010) apportant un indice supplémentaire, que l'hypométabolisme du glucose est un biomarqueur précoce de la MA.

Problématique

La MA se caractérise par un déficit cognitif et mnésique causé par des dysfonctionnements synaptiques et une dégénérescence neuronale progressive. Ceux-ci sont associés à une accumulation cérébrale de peptide amyloïde- β conduisant à la formation de plaques insolubles et à l'apparition plus tardive d'enchevêtrements neurofibrillaires (Braak and Braak, 1991). Si à ce jour, les thérapies demeurent inefficaces, cela est très certainement dû à une prise en charge trop tardive des patients chez qui les dommages sont déjà irréversibles.

L'hypométabolisme du glucose dans des régions corticales sélectives (le cortex frontal et temporo-pariétal) est une caractéristique physiopathologique invariante de la MA. Cet évènement préclinique concerne aussi bien les formes familiales que sporadiques. Son apparition précède les dysfonctions cognitives et les altérations pathologiques de la maladie (Cunnane et al., 2011 ; Jack et al., 2013 ; Reiman et al., 1996 ; Small et al., 1995).

Le métabolisme énergétique est essentiel aux fonctions neuronales et à l'intégrité du tissu nerveux (Iadecola, 2004). Des déficits métaboliques précoces pourraient être à l'origine des dysfonctionnements synaptiques et de la neurodégénérescence tardive caractéristiques de la MA (Chen and Zhong, 2013).

Les cellules pyramidales glutamatergiques jouent un rôle central dans le métabolisme cortical. Elles régulent l'apport énergétique par une augmentation locale de la perfusion sanguine (Lecrux et al., 2011), favorisent le transport du glucose (Magistretti, 2006) et stimulent la libération de lactate par les astrocytes (Bittner et al., 2011 ; Bouzier-Sore et al., 2003, 2003 ; Choi et al., 2012) (voir **chapitre I.C.1.** de l'introduction). Une altération précoce de ces neurones pourrait donc contribuer aux déficits métaboliques de la MA.

Mon principal projet de thèse a porté sur l'étude du métabolisme des neurones pyramidaux corticaux dans la MA. L'objectif de cette étude a été d'évaluer le métabolisme du glucose dans les cellules pyramidales des couches **II** et **III** du cortex en tonneaux dans un modèle murin de la MA, à un stade juvénile asymptomatique.

Pour la mener à bien, j'ai travaillé *ex vivo* sur des tranches aiguës de cortex somatosensoriel de souris. J'ai utilisé une approche pluridisciplinaire combinant électrophysiologie (technique de patch-clamp), biologie moléculaire (RT-PCR en multiplex sur cellule unique), pharmacologie (application d'inhibiteurs spécifiques de certaines voies métaboliques) et imagerie dynamique du glucose grâce à un biosenseur basé sur la technique de Transfert par Résonance d'Énergie de Fluorescence (FRET⁹⁰). Les principaux résultats attendants à ce projet vont donner lieu à un article présenté dans la section "Résultats".

Pour étudier les altérations métaboliques d'un point de vue fonctionnel, les flux de glucose intracellulaires ont été visualisés au moyen d'un biosenseur basé sur le principe du FRET et codé génétiquement (Bittner et al., 2010 ; Deuschle et al., 2005a ; Imamura et al., 2009). Les données d'imagerie collectées sur 59 tranches et 470 neurones suggèrent que les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD sont le siège d'une plus forte activité métabolique générale alors que la voie des PPP semble moins recrutée que chez les souris non Tg.

Afin de vérifier si les anomalies métaboliques détectées par imagerie FRET avaient une origine moléculaire, des enregistrements par patch-clamp combinés à des RT-mPCR sur cellules uniques (Cauli et al., 1997, 2004) ont été pratiqués. Les profils d'expression de 13 gènes incluant des marqueurs d'identité neuronale et des gènes clés du métabolisme du glucose ont été analysés dans 28 cellules pyramidales de souris non Tg et 31 de souris 3xTg-AD. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les cellules pyramidales de souris 3xTg-AD et celles des souris non Tg.

Les modifications des flux métaboliques détectées par imagerie FRET dans les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD juvéniles ne semblent pas sous-tendues par une altération d'expression des gènes liés au métabolisme.

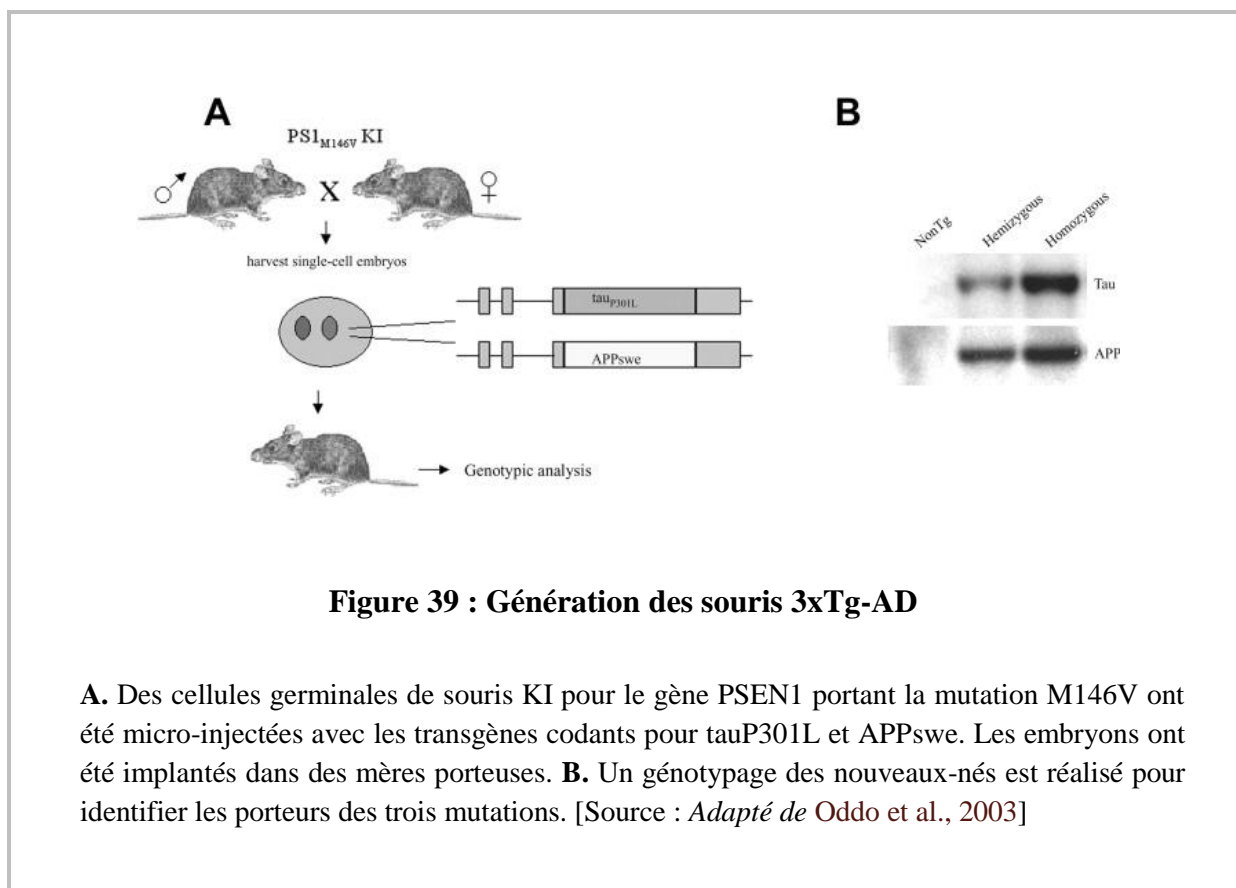
⁹⁰ FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

Matériels et Méthodes

Les matériels et méthodes ayant été développés avec soin dans l'article, le modèle murin avec lequel j'ai travaillé ainsi que la structure de la sonde FRET utilisée pour imager les flux de glucose seront brièvement présentés ici.

A. Les souris 3xTg comme modèle d'étude de la MA

L'étude a été menée sur le modèle des souris Alzheimer triples transgéniques (3xTg-AD), développé en 2003 par Oddo et ses collègues dans l'équipe de F. LaFerla. Les souris 3xTg-AD expriment les gènes humains mutés PS1M146V, APPSwe, et tauP301L. Pour créer ce modèle, les transgènes APPSwe et tauP301L ont été directement introduits dans des cellules germinales de souris portant la mutation PSEN1 M146V, précédemment insérée dans le génome (KI⁹¹) (Figure 39) (Oddo et al., 2003).



⁹¹ KI : *Knock In*

A ce jour, les souris 3xTg sont le seul modèle murin à présenter à la fois des déficits synaptiques et mnésiques, des plaques amyloïdes, une dégénérescence neurofibrillaire et des altérations métaboliques (Nicholson et al., 2010 ; Oddo et al., 2003 ; Yao et al., 2009). C'est pourquoi ce modèle semble particulièrement pertinent pour étudier le métabolisme cérébral à différents stades de la pathologie.

B. Etude du métabolisme au moyen de sondes FRET

Le nanosenseur FLII12Pglu700 $\mu\Delta$ 6 fonctionne sur le principe du FRET. Il possède une CFP comme donneur de fluorescence et une YFP comme accepteur. L'élément de reconnaissance du senseur est dérivé d'une protéine périplasmique de liaison au glucose et au galactose (MglB) provenant de la bactérie *Escherichia coli* (Hou et al., 2011).

La liaison de substrats spécifiques (glucose et galactose) sur le biosenseur entraîne un changement conformationnel rapprochant les deux fluorophores, ce qui favorise le FRET (**Figure 40**). La liaison réversible du glucose sur le senseur provoque une augmentation de l'émission de la YFP au dépend de la CFP. Sa constante de dissociation est de 700 μ M (Deuschle et al., 2005b) et permet donc le suivi du métabolisme du glucose dans une gamme de concentrations physiologiques (Bittner et al., 2010).

1. Expression en tranches des biosenseurs FRET codés génétiquement

La transduction des biosenseurs FLII12Pglu700 $\mu\Delta$ 6 du glucose (Deuschle et al., 2005b) est réalisée par un virus Sindbis déficient pour la réplication (Drobac et al., 2010) et présentant un fort tropisme pour les cellules pyramidales (Drobac et al., 2010 ; Hu et al., 2011).

2. Imagerie dynamique du métabolisme

L'efficacité de la transduction est évaluée à l'objectif 4X (NA 0.10) par visualisation de la fluorescence YFP des biosenseurs. Les tranches sont excitées à 500 nm par un système de diodes électroluminescentes (Precise Excite, CoolLED) connecté au port d'épifluorescence

du microscope. La largeur du spectre de lumière incidente est affinée par un filtre passe-bande (HC 500/24, Semrock) et la fluorescence jaune est collectée grâce à un miroir dichroïque (HC BS 520, Semrock) et un filtre passe-bande (HC 542/27, Semrock) montés dans un cube à filtres. Les images de fluorescence sont capturées par une caméra digitale refroidie à -30°C (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific) en réalisant un binning 2×2 de manière à minimiser les temps d'exposition. Le champ d'observation est déterminé dans les couches **II-III** à l'objectif 40X (NA 0.80) par visualisation de la fluorescence YFP (Fig. 6 et 7). Les images CFP et FRET sont obtenues comme précisé dans l'article.

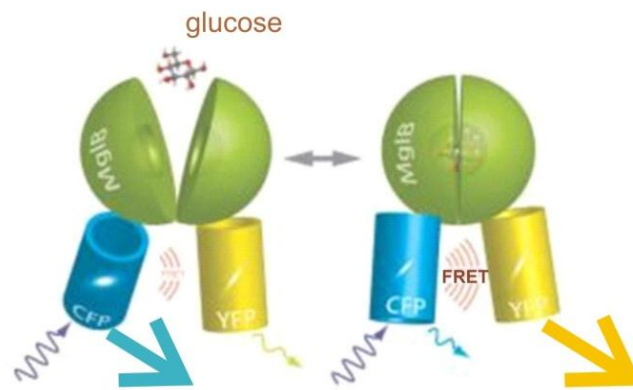


Figure 40 : Fonctionnement du biosenseur FLII12Pglu700 $\mu\Delta$ 6

Lorsque le nanosenseur FLIPglu700 μM est libre, l'excitation de la CFP provoque une forte émission de fluorescence. Lorsqu'il se lie au glucose, un changement de conformation du senseur favorise le transfert de fluorescence entre la CFP et la YFP. [Source : *Adapté de Hou et al., 2011*]

3. Inhibiteurs pharmacologiques des voies métaboliques

Afin de maintenir une osmolarité constante, la réduction de la concentration en glucose du LCRa est compensée par une augmentation de la concentration en saccharose. Les LCRa contenant des inhibiteurs pharmacologiques ont été préparés à partir de solutions stock concentrées en iodoacétate (Sigma, 200 mM) ou en 6-Aminonicotinamide (6-AN) (Sigma, 100 mM) dissous dans l'eau.

Résultats : Article

**Altérations précoces du métabolisme du glucose dans les
cellules pyramidales supragranulaires d'un modèle murin
de la maladie d'Alzheimer**

Early alterations of supragranular pyramidal cells glucose metabolism in a mouse model of Alzheimer's disease.

Juliette Piquet¹, Xavier Toussay¹, Régine Hepp¹, Rodrigo Lerchundi², Juliette Ledouce², Émilie Faivre², Elvire Guiot¹, Gilles Bonvento², Bruno Cauli¹.

1. *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France.*
2. *Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale (DRF), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), Molecular Imaging Center (MIRGen), CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.*

Running title: Early alterations of pyramidal cells glucose metabolism

Figures: 7, Table: 1

Abstract : 183 words

Introduction : 412 words

Discussion : 1500 words

Corresponding author:

Bruno Cauli, PhD

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS,

Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS),

75005 Paris, France.

Tel : (33) 1 44 27 25 80

Fax: (33) 1 44 27 25 84

E-mail : bruno.cauli@upmc.fr

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements:

This work was supported by grants from, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR 2011 MALZ 003 01; B.C. and G.B.) "IHU Institut de Neurosciences Translationelles de Paris," (ANR-10-IAIHU-06; B.C.), the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau / Rotary Club de France (AOE-7 "Espoir en tête 2014"; B.C.) and by the association France Alzheimer (ASTROinAD; B.C. and G.B.).

Abstract

The visualization of an impairment of cerebral glucose utilization is an early and predictive biomarker of Alzheimer's disease (AD) progression that is likely to aggravate impairment of memory and cognition during the progression of the disease. Yet, despite this importance the cellular and molecular mechanisms underlying the establishment of this alteration remain poorly understood. Here we studied the glucose metabolism of supragranular pyramidal cells and its alteration at a very early presymptomatic stage in 3xTg-AD mice, a mouse model of AD replicating numerous hallmarks of the disease. Using intracellular glucose imaging with a genetically encoded Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-based glucose nanosensor and transcriptomic profiling of key molecular elements of glucose metabolism with single-cell multiplex RT-PCR (scRT-mPCR), we found that juvenile 3xTg-AD pyramidal cells exhibit an increased glycolytic rate and a decreased activity of the pentose phosphate pathway without alteration of neuronal glucose uptake and transcriptional modification. We also disclosed an increased glucose metabolic pathway that occurs in 3xTg-AD neurons under glycolysis inhibition. These findings indicate the early alterations of glucose metabolism of pyramidal cells would dramatically increase their vulnerability to various insults.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive cognitive impairment and memory loss. The underlying neuropathology includes brain deposition of amyloid plaques formed by misfolded amyloid- β (A β), neurofibrillary tangles and neuronal loss (Braak and Braak, 1991; Hardy and Selkoe, 2002). The visualization by ^{18}F fluoro-2-Deoxy-D-glucose positron emission tomography of a decreased cerebral glucose utilization occurring in specific brain regions is one of the earliest functional signs of AD (Small et al., 2000; Dubois et al., 2016). It aggravates with disease progression and even predicts the neuropathological diagnosis in AD (Mosconi, 2005; Mosconi et al., 2010).

The most vulnerable brain regions to A β deposition corresponds to regions where glucose is substantially used outside its role as substrate for oxidative phosphorylation in spite of oxygen availability (Vaishnavi et al., 2010; Vlassenko et al., 2010). This non-oxidative glucose metabolism is referred as "aerobic glycolysis" and includes the glycolysis itself, the pentose phosphate shunt and the glycogen pathway which can be deleterious (Herrero-Mendez et al., 2009; Vilchez et al., 2007) or beneficial (Vaughn and Deshmukh, 2008) for neuronal survival. In addition, the use of glucose in the hexoseamine biosynthetic pathway protects tau protein from hyperphosphorylation and restricts neurofibrillary tangles formation (Liu et al., 2009).

Energy supply and neuronal metabolism shape neuronal activity (Cunningham et al., 2006) which modulates the formation and secretion of A β (Kamenetz et al., 2003; Cirrito et al., 2005; Dolev et al., 2013). In turn, A β peptide and deposits alter neuronal activity (Busche et al., 2008; Yamamoto et al., 2011; Kamenetz et al., 2003). Collectively, these observations indicate that quantitative and qualitative early alterations of neuronal glucose metabolism might be initiating, or at least aggravating factors of AD progression.

Using 3xTg-AD mice, a mouse model that replicates the neuropathological hallmarks of AD (Oddo et al., 2003; Carroll et al., 2010) and impaired cerebral metabolism (Nicholson et al., 2010; Ding et al., 2013; Yao et al., 2009), we studied at a presymptomatic early stage the glucose metabolism of layer II-III pyramidal neurons, a cell type playing a key role in glucose supply via neurovascular interactions (Lacroix et al., 2015; Lecrux et al., 2011). We used a genetically encoded FRET-based

glucose nanosensor (Deuschle et al., 2005;Bittner et al., 2010;Takanaga et al., 2008) to investigate at a high spatial resolution the uptake and fate of glucose and scRT-mPCR to determine the expression profiles of key elements of glucose metabolism of pyramidal cells. We report that 3xTg-AD pyramidal cells exhibit increased and decreased activities of glycolysis and pentose phosphate pathway respectively, without alteration of glucose uptake and transcriptional modification.

Materials and Methods

Animals

3xTg-AD (MMRRC #034830) and wild type non transgenic mice (11-19 postnatal days) were used for glucose imaging and patch-clamp recordings in acute slices. 3xTg-AD mice express the mutated gene PS1M146V (knock-in) and the mutated human genes APPSwe and tauP301L in the same locus, both under the control of the mouse Thy1.2 regulatory element (Oddo et al., 2003). All animals were housed in a temperature-controlled (21–25°C) room under daylight conditions and were given water and food *ad libitum*. A maximum of 5 mice are housed per cage and single animal housing was avoided. All experimental procedures using animals were performed in strict accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130) and conformed to the ethical guidelines of both the European Economic Community (86/609/EEC). The IBPS animal facility is accredited by the French authorities (A75-05-24).

Subcloning and viral production

The glucose sensor FLII¹²Pglu-700 μ Δ 6 (Takanaga et al., 2008) was used in this study. The coding sequence of the sensor was subcloned into the viral vector pSinRep5 (Invitrogen). Sindbis virus were produced as previously described (Hepp et al., 2007;Hu et al., 2011). Recombinant pSinRep5 and helper plasmid pDH26S were transcribed in vitro into capped RNA using the Megascript SP6 kit (Ambion). Baby hamster kidney-21 (ATGC #CCL-10) cells were electroporated with sensor-containing RNA and helper RNA ($2 \cdot 10^7$ cells, 950 μ F, 230 V) and incubated for 24 h at 37°C in 5 %CO₂ in Dulbecco's modified Eagle Medium supplemented with 5% fetal calf serum before collecting cell supernatant containing the viruses. The virus titer (10^6 - 10^8 infectious particles/ml) was determined after counting fluorescent baby hamster kidney cells infected using serial dilution of the stock virus.

Slice preparation

After decapitation brains were quickly removed and placed into cold (~4°C) oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 15 sucrose, and 1 kynurenic acid (Sigma). Coronal slices (300 µm thick) containing the barrel cortex were cut with a vibratome (VT1000S; Leica) and allowed to recover at room temperature for at least 1h in aCSF saturated with O₂/CO₂ (95 %/5 %) as previously described (Karagiannis et al., 2009).

Brain slice viral infection

Brain slices were placed onto a millicell-CM membrane (Millipore) with culture medium (50% minimum essential medium, 50% Hank's balanced salt sodium, 6.5 g/l glucose and 100 U/ml penicillin / 100 µg/ml streptomycin; Invitrogen). Infection was performed by adding ~5 x 10⁵ particles per slice. Slices were incubated overnight at 35°C in 5% CO₂. The next morning, brain slices were equilibrated for 1h in aCSF containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 2.5 glucose, 22.5 sucrose. Slices were then placed into the recording chamber and heated at ~30 °C and continuously perfused at 1-2 ml/min.

FRET imaging

Recordings were made from visually identified pyramidal cells in layer II-III of the mouse somatosensory cortex. Wide-field fluorescent images were obtained using a double port upright microscope (BX51WI, WI-DPMC Olympus) with a 40x objective (LUMPlan FL N 40x/0.80 W) and a digital CCD camera (CoolSnap HQ2, Roper Scientific) attached on the front port of the microscope. The glucose sensor FLII¹²Pglu-700µΔ6 was excited at 400 nm with a Light Emitting Device (LED, CoolLED, Precise Excite) using Imaging Workbench 6.0.25 software (INDEC BioSystems) and excitation (HC 438/24, Semrock) and dichroic filters (HC BS 458, Semrock). Double fluorescence images were collected every 15s by alternating the fluorescence emission filters for the CFP (HC 483/32 Semrock) and the YFP (HC 542/27, Semrock) using a filter wheel (Lambda 10B, Sutter

Instruments). In parallel, infrared transmitted light images of slices were continuously monitored on the back-port of the microscope using an infrared collimated LED as a light source (780 nm, Thorlabs), Dodt gradient contrast optics (DGC, Luigs and Neumann, (Dodt and Zieglgansberger, 1998)), a customized beam splitter (725 DCSPXR, Semrock) and an analogic CCD camera (XC ST-70 CE, Sony). The focal plane was maintained constant on-line using infrared DGC images of cells as anatomical landmarks (Lacroix et al., 2015). To compensate for potential x-y drifts all images were realigned off-line using the "StackReg" plug-in (Thevenaz et al., 1998) of ImageJ 1.48 software. Fluorescence ratios were calculated by dividing the registered YFP images by the registered CFP images using FIJI (<http://fiji.sc/Fiji>). Regions of interest (ROIs) corresponding to the soma of fluorescently labeled pyramidal cells were manually delineated. The mean ratio was measured at each time point using the same ROIs. The experiments lasted more than 30 minutes, leading to a small drift in the ratio baseline (Fig. 1B). The drift was corrected using a linear curve fitting (John et al., 2008) using Clampfit 10.4 software (MDS). Variations of fluorescence ratio were expressed as the ratio $(R-R_0)/R_0$ where R corresponds to the fluorescence ratio in the ROI at a given time point, and R_0 corresponds to the mean fluorescence ratio in the same ROI during the 10 min control baseline prior to changes in extracellular glucose concentration or application of drugs.

Whole-cell recordings

Patch pipettes (4-6 M Ω) pulled from borosilicate glass were filled with 8 μ l of RNase free internal solution containing in (mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 0.5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2 (285 / 295 mOsm). Whole-cell recordings were performed at $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ using a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, MDS). Data were filtered at 5-10 kHz and digitized at 50 kHz using an acquisition board (Digidata 1440, MDS) attached to a personal computer running pCLAMP 10.2 software package (MDS). Membrane potential values were not corrected for liquid junction potential. Resting membrane potential of neurons was measured just after passing in whole-cell configuration. Only neurons with a resting membrane potential more negative than -60 mV were analyzed further. 32 electrophysiological properties chosen to describe the electrophysiological diversity of cortical neurons (Ascoli et al., 2008) were determined as previously described (Karagiannis et al., 2009).

Cytoplasm harvest and scRT-PCR

At the end of the whole-cell recording lasting less than 15 min, the cytoplasmic content was aspirated in the recording pipette. The pipette's content was expelled into a test tube and RT was performed in a final volume of 10 μ l, as described previously (Lambolez et al., 1992). The scRT-PCR protocol was designed to probe simultaneously for the expression of key molecular elements of glucose metabolism and markers of glutamatergic (vGluT1) and GABAergic (GAD65 and GAD67) neurons. The key molecular elements of glucose metabolism included the glucose transporters; GluT1 and GluT3, the hexokinase isoform; HK1, the phosphofructokinase-2 isoform; Pfkfb3, the muscle, liver and platelet isoforms of phosphofructokinase-1 (PFK1m, PFK1l and PFK1p), the glucose-6-phosphate dehydrogenase; G6PDx, the muscle isoform of glycogen synthase (Gys1) and the brain glycogen phosphorylase (PygB). Two-steps amplification was performed essentially as described (Cauli et al., 1997) using the primer pairs listed in Table 1. 10 μ l of each individual PCR product were run on a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide using Φ X174 digested by *Hae*III as a molecular weight marker.

Drugs

Changes in extracellular glucose concentration were compensated by changes in sucrose concentration to maintain the osmolarity of the aCSF constant as previously described (Miki et al., 2001). Iodoacetic acid and 6-animonicotinamide (6-AN) were purchased from Sigma-Aldrich.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Statistica 6 (Statsoft). All values are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance of FRET ratio changes and electrophysiological properties of pyramidal cells of 3xTg-Ad and non Tg mice was determined using the Mann-Whitney U test. Comparison of the occurrence of the genes expressed by pyramidal cells of the two mice lines was determined

using Fisher's exact test. Statistical significance on all figures uses the following convention: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Results

Glucose uptake

We used a recombinant Sindbis virus (see Materials and Methods) to express the FRET glucose sensor FLII¹²Pglu-700 μ Δ 6 (Takanaga et al., 2008) in neurons of neocortical slices. Expression of the biosensor was preferentially observed in pyramidal cells of layers II-III (Fig. 1A) and V, consistent with previous reports (Hu et al., 2011; Drobac et al., 2010). The sensor was observed both in the soma and in the dendrites of neurons (Fig. 1A). Optical recordings were performed in layer II-III by measuring the YFP/CFP emission ratio of the biosensor.

We first evaluated the capability of supragranular neuron to take-up glucose by monitoring changes in intracellular glucose during an increase in extracellular glucose concentration (John et al., 2008; Takanaga et al., 2008). Increasing extracellular glucose from 2.5 mM, a physiologically relevant glucose concentration (Silver and Erecinska, 1994), to 10 mM, a glucose concentration nearly saturating the sensor (Takanaga et al., 2008) and classically used in brain slices experiments, lead to a slowly developing increase in fluorescence emission ratio (Fig. 1). This indicates that pyramidal neurons from juvenile mice have a low glucose uptake capability. During application of 10 mM glucose the relative increase in fluorescence ratio was $3.6 \pm 0.3\%$ in non Tg neurons vs. $3.2 \pm 0.3\%$ in 3xTg-AD neurons after 10 min. ($U(74,57)=1961$, $p=0.4948$), $5.6 \pm 0.3\%$ vs. $5.4 \pm 0.4\%$ ($U(74,57)=1938$, $p=0.4299$) after 20 min., $6.9 \pm 0.4\%$ vs. $6.9 \pm 0.6\%$ ($U(74,57)=2015$, $p= 0.6653$) after 30 min., $8.1 \pm 0.5\%$ vs. $8.2 \pm 0.8\%$ ($U(74,57)=2046$, $p= 0.7725$) after 40 min. and $9.3 \pm 0.6\%$ vs. $9.2 \pm 0.9\%$ after ($U(74,57)=1988$, $p= 0.5771$) after 50 min. These results revealed that the glucose uptake kinetics were very similar between pyramidal cells of juvenile non Tg and 3xTg-AD mice (Fig. 1C).

Glucose metabolic activity

We next thought to evaluate the resting metabolic activity of pyramidal cells, by reducing extracellular glucose concentration (Bittner et al., 2010). Decreasing extracellular glucose from 2.5 mM to 0.2 mM led to a marked drop in relative fluorescence ratio (Fig. 2). Examination of the dynamics of intracellular glucose revealed subtle differences between the metabolic activity of pyramidal cells of juvenile non Tg and 3xTg-AD mice (Fig. 2A). After 5 min. of extracellular glucose reduction the drop was stronger in non Tg than in 3xTg-AD mice ($-6.8 \pm 0.3\%$ vs. $-5.6 \pm 0.3\%$, $U(65,88)= 2105$, $p=0.0053$) indicating a lower metabolic activity in 3xTg-AD mice (Fig. 2). In contrast longer glucose restrictions disclosed a higher metabolic activity in 3xTg-AD pyramidal cells (Fig. 2). Such a difference in metabolic activity was observed as early as 10 min after glucose restriction ($-15.1 \pm 0.3\%$ vs. $-16.4 \pm 0.4\%$, $U(65,88)= 2163$, $p= 0.0101$, Fig. 2B) and persisted during glucose restrictions of 15 min. ($-19.1 \pm 0.3\%$ vs. $-20.8 \pm 0.4\%$, $U(65,88)= 1828$, $p= 0.00013$) and 20 min ($-21.1 \pm 0.4\%$ vs. $-22.6 \pm 0.4\%$, $U(65,88)= 2058$, $p= 0.0031$, Fig. 2B). These data indicate that the metabolic activity is altered in juvenile 3xTg-AD pyramidal cells. They also suggest that several glucose pathways are differentially affected.

To evaluate the relative contribution of the different glucose pathways to the glucose metabolic activity of pyramidal cells we first inhibited glycolysis using iodoacetic acid, a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor that does not interfere with FRET glucose sensors (John et al., 2008;Bittner et al., 2010). We used 200 μ M iodoacetic acid, a concentration that efficiently inhibits glycolysis in brain slices (Yang et al., 1999) with modest impact on the pentose phosphate pathway (Schmidt and Dringen, 2009). Bath application of iodoacetic acid induced a slowly developing increase in relative fluorescence ratio in non Tg pyramidal cells (Fig. 3A). This intracellular glucose accumulation is consistent with a low glycolytic activity in cortical neurons (Yang et al., 1999;Bittner et al., 2010). Surprisingly, in pyramidal cells of 3xTg-AD mice iodoacetic acid led to a transient decrease in intracellular glucose followed by an increase (Fig. 3A). This transient decrease, absent in pyramidal cells of non Tg mice, was particularly marked after 10 min. of iodoacetic acid application ($0.0 \pm 0.3\%$ vs. $-3.1 \pm 0.5\%$, $U(34,11)= 20$, $p= 4.979 \cdot 10^{-7}$, Fig. 3). The intracellular glucose dynamics of non Tg and 3xTg-AD pyramidal cells crossed after 15 min. of glycolysis inhibition (Fig. 3A) and did not differ significantly after 20 min. ($1.0 \pm 1.0\%$ vs. $3.8 \pm 1.2\%$, $U(34,11)= 122$, $p= 0.0886$, Fig. 3B). A

longer exposure to iodoacetic acid revealed a smaller intracellular glucose increase in non Tg than in 3xTg-AD pyramidal neurons ($8.0 \pm 1.6\%$ vs. $15.2 \pm 1.2\%$, $U(34,11)= 94$, $p= 0.0130$). These observations indicate that the rate of glycolysis is higher in 3xTg-AD than in non Tg pyramidal cells. They also revealed that glycolysis blockade disinhibited a glucose metabolic pathway in 3xTg-AD, but not in non Tg, pyramidal cells.

To further determine the glucose metabolic pathways altered in 3xTg-AD pyramidal cells we next evaluated the relative contribution of the pentose phosphate shunt, a glucose pathway that promotes neuronal survival (Vaughn and Deshmukh, 2008). Blockade of the glucose-6-phosphate dehydrogenase, the rate limiting enzyme of the pentose phosphate pathway, with 6-AN (1 mM) induced a small and slowly developing increase in intracellular glucose concentration in non Tg and 3xTg-AD pyramidal cells (Fig. 4). This increase was much smaller in 3xTg-AD than in non Tg neurons after 10 min. ($1.9 \pm 0.2\%$ vs. $0.1 \pm 0.2\%$, $U(30,38)= 180$, $p= 3.600 \cdot 10^{-7}$), 20 min. ($3.4 \pm 0.3\%$ vs. $0.5 \pm 0.3\%$, $U(30,38)= 166$, $p= 1.137 \cdot 10^{-7}$) and 30 min. of bath application of 6-AN ($5.5 \pm 0.6\%$ vs. $2.0 \pm 0.6\%$, $U(30,38)= 130$, $p= 4.111 \cdot 10^{-9}$, Fig. 4). These results indicate that the activity of the pentose phosphate pathway is rather weak in pyramidal cells compared to that of the glycolysis (Fig. 3). They also revealed that it is dramatically impaired in 3xTg-AD neurons.

We next investigated further the metabolic pathway disinhibited in 3xTg-AD neurons by glycolysis inhibition. We simultaneously applied iodoacetic acid and 6-AN to inhibit both glycolysis and the pentose phosphate pathway. Such a combined inhibition induced a transient decrease in intracellular glucose that was much stronger in 3xTg-AD than in non Tg neurons (Fig. 5). It was already evident after 10 min. of combined inhibition ($0.1 \pm 0.1\%$ vs. $-0.6 \pm 0.2\%$, $U(37,36)= 452$, $p= 0.0179$) and was particularly marked after 20 min ($-0.7 \pm 0.2\%$ vs. $-3.2 \pm 0.7\%$, $U(37,36)= 374$, $p= 1,077 \cdot 10^{-3}$, Fig. 5). Interestingly, a longer inhibition resulted in similar intracellular glucose dynamics between non Tg and 3xTg-AD pyramidal cells ($7.1 \pm 0.4\%$ vs. $6.7 \pm 1.2\%$, $U(37,36)= 611$, $p= 0.5498$, Fig. 5). These observations suggest that the early and transient increase in metabolic activity induced by iodoacetic acid (Fig. 3) is not due to an increased activity of the pentose phosphate pathway. They also indicate that the later and higher impact of glycolysis inhibition in 3xTg-AD neurons on the increase in intracellular glucose (Fig. 3) is compensated by a lower pentose phosphate activity in these neurons (Fig. 4 and 5). Altogether our glucose imaging data have indicated that 3xTg-AD

pyramidal cells have a higher glycolytic activity and a smaller pentose phosphate activity than non Tg neurons.

Molecular characterization of layer II-III pyramidal cells

In order to determine whether the alterations in glucose metabolism were mediated by changes in transcriptomic program we determined the expression profiles of key molecular elements of glucose metabolism in non Tg and 3xTg-AD pyramidal cells by single cell RT-multiplex PCR (scRT-mPCR). The protocol was designed to probe for the expression of vGluT1 and, GAD65 and 67, respectively taken as glutamatergic and GABAergic markers. The key elements of glucose metabolism included two glucose transporters GluT1 and GluT3, the hexokinase isoform HK1, the main brain phosphofructokinase-2 isoform; Pfkfb3. the muscle, liver and platelet isoforms of phosphofructokinase-1 (PFK1m, I and p), the rate limiting enzyme of the pentose phosphate pathway (G6PDx), as well as glycogen synthase and phosphorylase isoforms Gys1 and PygB. The reliability of the scRT-mPCR was tested on 1 ng of total RNA purified from mouse whole brain. As expected, all PCR generated fragments had the sizes predicted by their mRNA sequences (Fig. 6 and Table 1) confirming the sensitivity of the procedure (Cauli et al., 1997).

Layer II-III pyramidal cells were first visually identified on the basis of the triangular shape of their soma and by the presence of a prominent apical dendrite. Only neurons exhibiting a resting membrane potential more hyperpolarized than -60 mV were further taken into account. Pyramidal cells typically fired long duration action potentials with a pronounced frequency adaptation (Fig. 7A) characteristic of Regular Spiking neurons (Cauli et al., 1997; Karagiannis et al., 2009; Lacroix et al., 2015). We did not observe any obvious difference between the electrophysiological properties of non Tg and 3xTg-AD juvenile pyramidal cells (data not shown), consistent with previous reports (Yamamoto et al., 2011). Their glutamatergic phenotype was confirmed by the detection of vGluT1 mRNAs and the absence of GAD65 and GAD67 transcripts (Fig. 7B and C).

Glut1 and Glut3 mRNAs were respectively detected in 29% (n= 9 of 31 cells) and 48% (n=15 of 31 cells) in non Tg neurons and in 18% (n= 5 of 28 cells) and 21% (n=6 of 28 cells) in 3xTg-AD neurons (Fig. 7B and C). Consistent with the similar glucose capacity uptake in non Tg and 3xTg-AD layer II-

III pyramidal cells (Fig. 1), the occurrence of detection of GluT1 ($p= 0.3703$) and GluT3 ($p= 0.0555$) was not statistically different. Similarly, the frequency of detection of HK1 was not different between non Tg (42%, $n= 13$ of 31 cells) and 3xTg neurons (54%, $n= 15$ of 28 cells, $p= 0.4390$). Pfkfb3 was only detected in a minority of pyramidal cells of non Tg (13%, $n= 4$ of 31 cells) and 3xTg-AD (4%, $n= 1$ of 28 cells, $p= 0.3563$, Fig. 7B and C). The most frequently phosphofructokinase-1 isoforms detected in both non Tg and 3xTg-AD neurons were PFK1m (84%, $n= 26$ of 31 cells and 64%, $n= 18$ of 28 cells, $p= 0.1339$, Fig. 7B and C) and PFK1p (58%, $n= 18$ of 31 cells, and 50%, $n= 14$ of 28, cells, $p= 0.3598$, Fig. 7B and C). PFK1l was observed in 36% ($n= 11$ of 31 cells) and 29% ($n= 8$ of 28 cells, $p= 0.3874$ Fig. 7B and C) in non Tg and 3xTg-AD neurons respectively. The glucose-6 phosphate dehydrogenase isoform, G6PDx was detected in 16% ($n= 5$ of 31 cells) and 18% ($n= 5$ of 23 cells) of the non Tg and 3xTg-AD pyramidal cells respectively ($p= 1.000$, Fig. 7B and C). The glycogen synthase Gys1 was never detected in non Tg neurons (Fig. 7B and C) and rarely in 3xTg-AD neurons (7%, $n= 2$ out of 28, $p= 0.2209$). Finally the glycogen phosphorylase, PygB was observed in same proportion in non Tg (29%, $n= 9$ out of 31) and 3xTg-AD pyramidal cells (29%, $n= 8$ out of 28, $p= 1.000$).

Discussion

Here we studied glucose metabolism of supragranular pyramidal cells and its early alteration in a mouse model of AD. Using intracellular glucose imaging and scRT-mPCR, we found that glucose uptake was not altered in juvenile pyramidal cells. In contrast glycolysis and the pentose phosphate pathway were respectively higher and lower in 3xTg-AD neurons. We also disclosed an increased glucose metabolic pathway that occurs in 3xTg-AD neurons under glycolysis inhibition. The analysis of the molecular profile of key elements of glucose metabolism did not revealed any changes indicating that the observed early alterations of the metabolism of 3x-Tg-AD pyramidal neurons are likely due to post-transcriptional modifications.

Glucose uptake

In addition to GluT3, a well established neuronal glucose transporter (Nagamatsu et al., 1992;McCall et al., 1994;Fields et al., 1999), we also detected GluT1 in a minority of pyramidal cells, a transporter more classically described in glial and endothelial cells (McEwen and Reagan, 2004;Winkler et al., 2015;Simpson et al., 2007;Kacem et al., 1998). Nevertheless recent transcriptomic studies have revealed GluT1 expression in neurons (Cahoy et al., 2008), including layer II-III cortical pyramidal cells (Tasic et al., 2016). These observations indicate that supragranular pyramidal cells express GluT3 transcripts, but also those of GluT1 to a lesser extent.

Intracellular glucose imaging and scRT-mPCR analysis revealed that juvenile pyramidal cells have a low glucose uptake capability (Fig. 1) and a relatively weak expression of GluT1 and GluT3 mRNAs (Fig. 7). Consistently, both cerebral glucose utilization as well as GluT1 and GluT3 are low in rodents during the first postnatal weeks and increase in the adult (Nehlig, 1999;Vannucci and Simpson, 2003;Khan et al., 1999). In addition, adult rat cortical neurons were found to have a relatively low rate of glucose uptake *in vivo* (Chuquet et al., 2010) further supporting our observations. We did not observe significant changes in GluT1 and 3 expression or glucose uptake capability in juvenile 3x-Tg-AD pyramidal cells. Alterations in GluTs expression and glucose utilization have only been reported after six months of age in 3xTg-AD mice (Chen et al., 2012;Ding et al., 2013;Nicholson et al., 2010). This indicates that such impairments reveal themselves only after establishment of the metabolic developmental switch (Nehlig, 1999;Vannucci and Simpson, 2003;Khan et al., 1999).

Glucose fate in pyramidal cells

Consistent with previous reports, our molecular analysis revealed a substantial expression of HK1 in pyramidal neurons (Cahoy et al., 2008;Tasic et al., 2016), the predominant brain mammalian hexokinase isoform (Wilkin and Wilson, 1977;Fields et al., 1999;Khan et al., 1999). This suggests that juvenile pyramidal cells have already the capacity to metabolize glucose into glucose-6 phosphate as indicated by our glucose imaging observations (Fig. 2).

As previously observed (Cahoy et al., 2008;Tasic et al., 2016;Zeitschel et al., 1996;Bigl et al., 2003), the key enzymes of glycolysis PFK1m and PFK1p, but also FPK1I to a lesser extent, were frequently detected in juvenile pyramidal cells. In contrast, pfkfb3 was rarely observed (Tasic et al., 2016).

These molecular data indicate that pyramidal cells are well equipped for glycolysis. Consistently, our imaging data revealed an accumulation of intracellular glucose during application iodoacetic acid disclosing an active glycolysis in these neurons (Fig. 3).

The detection of transcripts for G6PDx, a major rate limiting enzyme of the pentose phosphate pathway, has also been reported (Ninfali et al., 1998; Cahoy et al., 2008; Tasic et al., 2016) suggesting that juvenile pyramidal cells can also use for the pentose phosphate pathway. In agreement with these molecular observations, blockade of the pentose phosphate pathway with 6-aminonicotinamide induced an increase of intracellular glucose (Fig. 3). Intracellular glucose accumulation was less marked during pentose phosphate pathway inhibition than during glycolysis inhibition, indicating that the latter pathway is more active in pyramidal cells. In line with these functional data, pyramidal cells were found to express more frequently a PFK1 isoforms than G6PDx. Consistent with the absence of glycogen in neurons (Vilchez et al., 2007) the glycogen synthase, Gys1, and the glycogen phosphylase, PygB, were rarely detected in pyramidal cells.

Overall our molecular and imaging data indicate that glycolysis and the pentose phosphate pathway are the two main active glucose pathways in juvenile pyramidal cells. Although glycolysis has been shown to be repressed at the post-translational level (Herrero-Mendez et al., 2009), these observations have been made in cultured embryonic neurons. Given that glucose metabolism undergoes substantial modifications during embryonic and postnatal development (Khan et al., 1999; Bilger and Nehlig, 1992; Nehlig, 1999; Coerver et al., 1998; Goren et al., 2000; Mhaskar et al., 2000; Zeitschel et al., 1996; Surin et al., 2012), it is likely that the rate of glycolysis is higher in juvenile than in embryonic cortical neurons. Consistently, recent observations have suggested that glucose is an efficient energy substrate during network activity in hippocampal slices from mature mice (Ivanov et al., 2014).

Alteration of glucose metabolic pathways in pyramidal cells

Our molecular observations did not reveal any significant change in the expression profile of key molecular elements of glucose metabolism between non Tg and 3xTg-AD juvenile pyramidal cells. In contrast, we observed a higher glycolytic activity and a less active pentose phosphate pathway in pyramidal cells of 3x-Tg-AD mice. To our knowledge, changes in expression of some of the analyzed

genes have only been reported after 6 months of age in 3xTg-AD mice (Ding et al., 2013;Chen et al., 2012). This suggests that the alterations of metabolic activity are more likely mediated by post-transcriptional and/or post-translational modifications. Interestingly, the activity of several key elements controlling glucose pathways are regulated at the post-translational level (Khan et al., 1999;Herrero-Mendez et al., 2009;Bolanos et al., 2008;Almeida et al., 2004;Vilchez et al., 2007). Given the low level of detection of *pfkfb3*, it is unlikely that 3xTg-AD pyramidal cells upregulate glycolysis via fructose-2,6-bisphosphate production (Herrero-Mendez et al., 2009;Almeida et al., 2004). Exposure to A β peptides has been shown to increase the glycolytic activity of astrocytes (Allaman et al., 2010). Such a modulation can barely explain the increased glycolysis in pyramidal cells since A β peptides are not detected in the neocortex of juvenile 3xTg-AD mice (Oddo et al., 2003;Carroll et al., 2010). Further investigations, beyond the scope of this study, will be needed to elucidate the mechanisms underlying the early alteration of metabolic pathways in 3xTg-AD pyramidal cells.

Upon glycolysis inhibition we observed an enigmatic transient increase in glucose utilization in 3xTg-AD pyramidal cells. A rerouting of glucose utilization towards the pentose phosphate pathway and/or glycogenesis is unlikely given that the increased glucose consumption induced by iodoacetic acid persisted in presence of 6-AN (Fig. 5) and that pyramidal neurons rarely express glycogen synthase (Fig. 7). An alternative possibility would be an increased glucose metabolism via the hexosamine biosynthetic pathway which competes with glycolysis for fructose-6-phosphate. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by iodoacetic acid would indeed stimulate the flux of the hexosamine pathway by blocking the flow of fructose-6-phosphate via glycolysis. The entry in this metabolic pathway is controlled by the rate limiting enzyme glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) which converts fructose-6-phosphate and glutamine to glucosamine-6-phosphate and glutamate (Buse, 2006). There is no evidence of altered expression of GFAT or downstream enzymes of the hexosamine pathway in 3xTg-AD mice (Chen et al., 2012;Gatta et al., 2016) suggesting that a putative increased of this pathway is rather mediated by post-translational modifications. An increased brain level of glutamine at a relatively early stage has been described in 3xTg-AD mice (Sancheti et al., 2014b). This supports the idea that glycolysis inhibition could favor of the hexosamine biosynthetic pathway by increasing the availability of the GFAT substrates. Given

that glutamine depends on astrocyte glycolysis, an increased feeding of the hexosamine biosynthetic pathway in 3xTg-AD pyramidal cells by iodoacetic acid is expected to be transient, consistent with our observations (Fig. 3 and 5). Interestingly, the hexosamine biosynthetic pathway is essential for O-N-acetylglucosamine glycosylation, a process that protects tau protein against hyperphosphorylation (Liu et al., 2009;Gatta et al., 2016). An increase in activity of this pathway might represent an early adaptive mechanism to prevent and/or delay neurofibrillary tangles formation in pyramidal cells. The later impairment of glucose uptake (Nicholson et al., 2010;Ding et al., 2013) and decreased levels of glutamine (Sancheti et al., 2014a) observed in 3xTg-AD mice is likely to reduce the activity of the hexosamine pathway leading to tau hyperphosphorylation and tangles formation (Gatta et al., 2016;Oddo et al., 2003;Carroll et al., 2010).

Conclusion

Our observations indicating alterations of the glucose metabolism of pyramidal cells at a very early stage may have dramatic consequences for their physiology and survival in the long-term. Indeed, neurons are poorly equipped to detoxify methylglyoxal, a harmful glycolysis byproduct (Belanger et al., 2011). An increased glycolytic activity is therefore expected to alter pyramidal cells survival (Herrero-Mendez et al., 2009). Similarly, a decreased pentose phosphate pathway would reduce the capacity of neurons to produce glutathione, impairing thereby their ability to detoxify deleterious reactive oxygen species (Vaughn and Deshmukh, 2008). A combined increased glycolysis and decreased pentose phosphate pathway in pyramidal cells would dramatically increase their vulnerability to various insults. Further investigations will be required to identify the mechanisms underlying these metabolic alterations and could provide potential targets for drug-modifying therapies.

Table 1: PCR primers

Genes Accession #	First PCR primers	Size (bp)	Second PCR nested primers	Size (bp)
vGluT1 NM_182993	Sense, -113: GGCTCCTTTTTCTGGGGCTAC <small>(Cabezas et al., 2013)</small> Antisense, 126: CCAGCCGACTCCGTTCTAAG <small>(Cabezas et al., 2013)</small>	259	Sense, -54: ATTCGAGCCAACAGGGTCT <small>(Cabezas et al., 2013)</small> Antisense, 79: TGGCAAGCAGGGTATGTGAC <small>(Cabezas et al., 2013)</small>	153
GAD65 NM_008078	Sense, 99: CCAAAAGTTCACGGGCGG <small>(Cabezas et al., 2013)</small> Antisense, 454: TCCTCCAGATTTTGCGGTTG <small>(Cabezas et al., 2013)</small>	375	Sense, 219: CACCTGCGACCAAAAACCCCT <small>(Cabezas et al., 2013)</small> Antisense, 447: GATTTTGCGGTTGGTCTGCC <small>(Cabezas et al., 2013)</small>	248
GAD67 NM_008077	Sense, 529: TACGGGGTTCGCACAGGTC <small>(Cabezas et al., 2013)</small> Antisense, 1109: CCCAGGCAGCATCCACAT <small>(Cabezas et al., 2013)</small>	598	Sense, 801: CCCAGAAGTGAAGACAAAAGGC <small>(Cabezas et al., 2013)</small> Antisense, 1034: AATGCTCCGTAACAGTCGTGC <small>(Cabezas et al., 2013)</small>	255
GluT1 NM_011400	Sense, 5: ATCCCAGCAGCAAGAAGGTGA Antisense, 317: AGAAGCCATAAGCACAGCAG	333	Sense, 88: ACTGGTGTCATCAACGCCCC Antisense, 230: CCGACAGAGAAGGAACCAATCA	164
GluT3 NM_011401	Sense, 1: ATGGGGACAACGAAGGTGAC Antisense, 336: GCATTTCAACAGACTCCGCTATC	358	Sense, 23: CATCTCTGGTGTTCCGCCGT Antisense, 314: GCGAATCCCATAAAGGCAGC	310
HK1 NM_001146100	Sense, 879: CGAGAAGATGGTGAGCGGC Antisense, 1333: GCCACTGCCACTCTCCGA	472	Sense, 986: TCACGAGGGGCAAGTTCACC Antisense, 1298: CCGAGTCAGGCACCAGGC	330
Pfkfb3 NM_001177752	Sense, 211: GTGGGAGAGTATCGGCGTGA Antisense, 685: ATTCGGCTCTGGATGTGGTC	494	Sense, 255: CAACTTCTCCGCCCTGACA Antisense, 596: CACATTTATCAGGGTCAAGAGGCT	365

PFK1m NM_001163487	Sense, 49: GCCATCGCCGTGTTGACC Antisense, 276: GTCGTCCTTCTCGCTCTCGG	247	Sense, 106: GCTGTGGTCCGAGTTGGTATCT Antisense, 246: ATCGGGCACTTCCAATCACT	160
PFK1l NM_008826	Sense, 180: AGGAGGCCGAGAACATCAAGC Antisense, 568: GCAGTGGTAGTGATGGCGTC	408	Sense, 304: GCCTACAATCTGCTCCAACACG Antisense, 451: TGGTCAAGTGTGCGTAGTTCTG	169
PFK1p NM_019703	Sense, 409: CGAAAGGAGTGGAGCGGA Antisense, 696: AAGGAACACCCAGTCGGCA	306	Sense, 438: GCTGGCTCGGAATGGTGAT Antisense, 637: TGTCTCCCATCACCTCCAG	219
G6PDx NM_008062	Sense, 206: GCTATGCCCGCTCACGAC Antisense, 232: GACGACATCCGAAAGCAGAGTG	303	Sense, 491: CCACGATGATGCGGTTCC Antisense, 353: ATGTGGCTGTTGAGGTGCTTAT	143
Gys1 NM_030678	Sense, 3: GCCTCTCAGCCGCACTCT Antisense, 294: ACGCCAAAATACACCTTACAA	313	Sense, 66: CGACCCCGAGAACGCAGT Antisense, 205: CCTCACACCCTGCTCCGT	157
PygB NM_153781	Sense, 108: GCATTTACGCTGGTCAAGG Antisense, 380: CCCAAGACCAGCATCCTCT	292	Sense, 156: CTTCTTCGCTCTGGCACACA Antisense, 244: CCAGGAAAGGTAATAGATGCG	110

Note: Position 1, first base of the start codon.

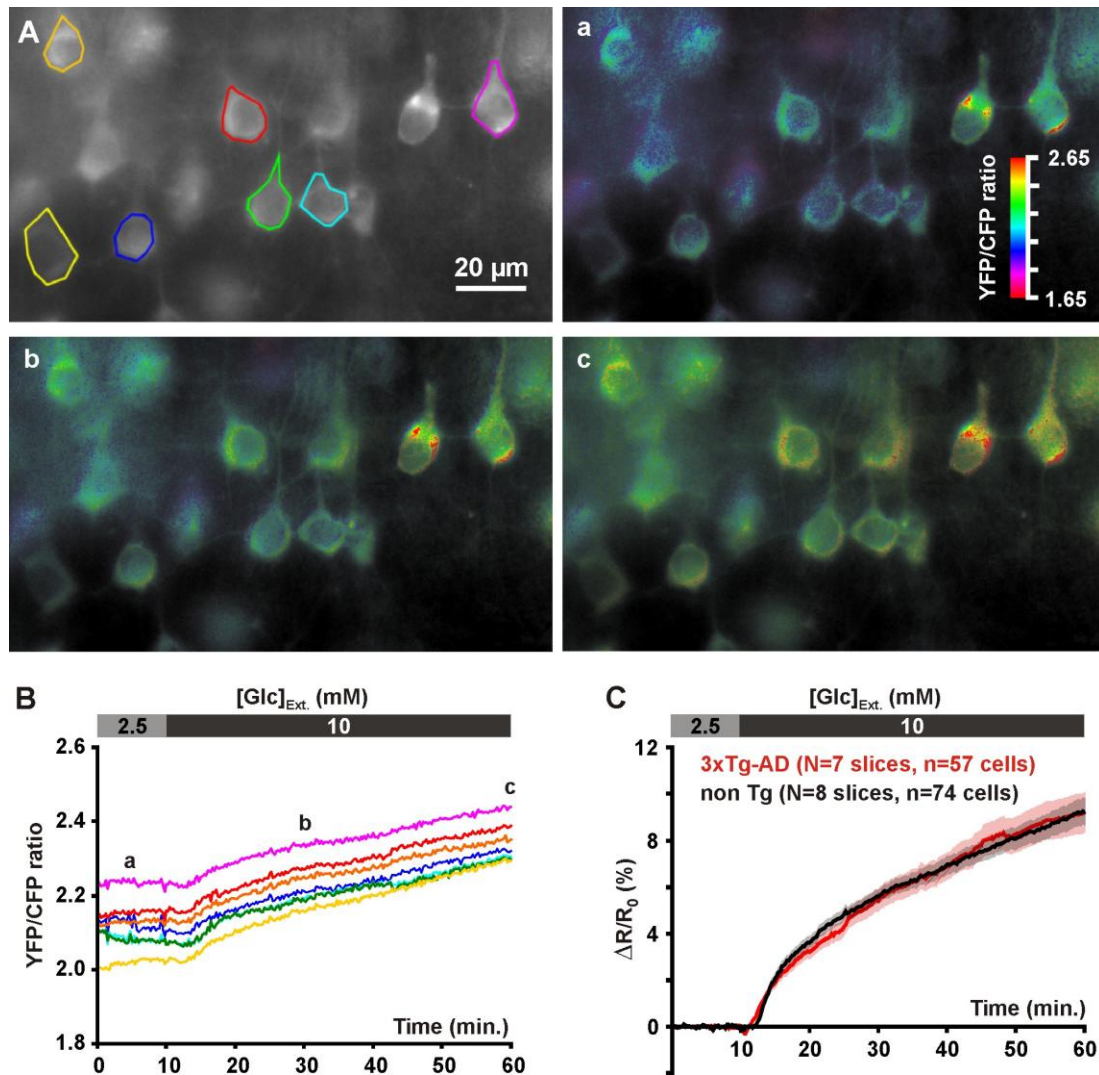


Figure 1: Glucose uptake in layer II-III pyramidal cells.

(A) The gray scale image shows the YFP fluorescence. Pseudocolor images show the YFP/CFP ratio value (coded by pixel hue, see scale bar in **(a)**) and the fluorescence intensity (coded by pixel intensity) at different time points before **(a)** and after **(b, c)** superfusion of 10 mM glucose. **(B)** Traces show average YFP/CFP ratio measure at the soma of individual pyramidal cells delineated in **(A)**. **(a)**, **(b)** and **(c)** indicate time points corresponding to the pseudocolor images shown in **(A)**. **(C)** Mean relative YFP/CFP ratio changes in pyramidal cells of non Tg (black trace) and 3xTg-AD mice (red trace) induced by superfusion of 10 mM glucose. Traces show means (solid lines) \pm standard errors of the mean (color shades). Note the slowly developing increase in mean relative ratio during 10 mM glucose superfusion and the similar temporal profiles between non Tg and 3xTg-AD mice.

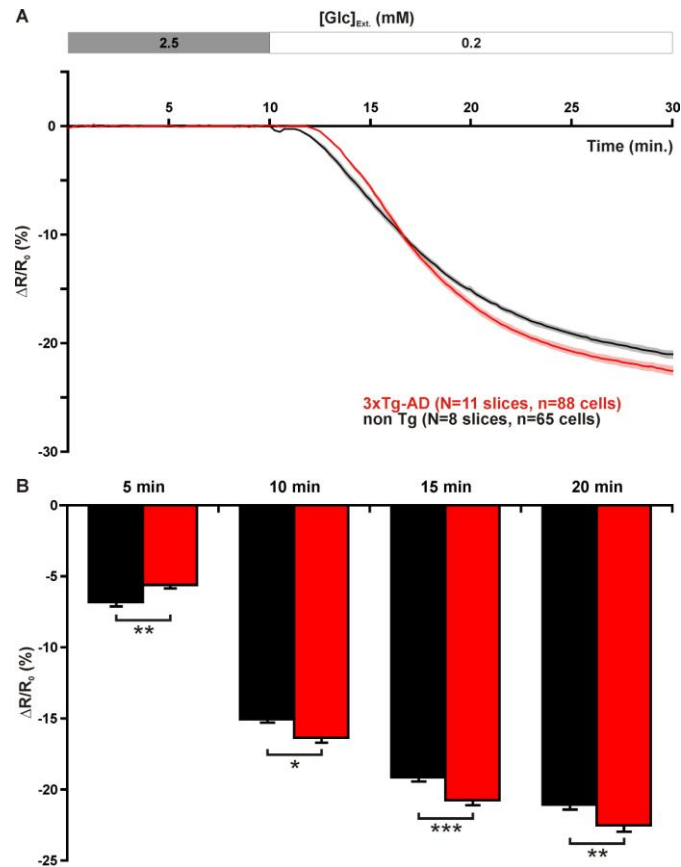


Figure 2: Metabolic activity of layer II-III pyramidal cells.

(A) Mean relative YFP/CFP ratio changes in pyramidal cells of non Tg (black trace) and 3xTg-AD mice (red trace) induced by glucose restriction (0.2 mM). Traces show means (solid lines) \pm standard errors of the mean (color shades). Note the slowly developing decrease in mean relative ratio during 0.2 mM Glucose superfusion. Note also the difference in the temporal profiles between non Tg and 3xTg-AD mice. **(B)** Histograms show the metabolic activity (decrease in relative YFP/CFP ratio) at different time of glucose restriction. After 5 min of glucose restriction pyramidal cells of non Tg mice exhibit a higher metabolic activity than those of 3xTg-AD mice. In contrast, during longer glucose restriction pyramidal cells of 3xTg-AD mice display a higher metabolic activity. *, ** and *** statistically significant with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively.

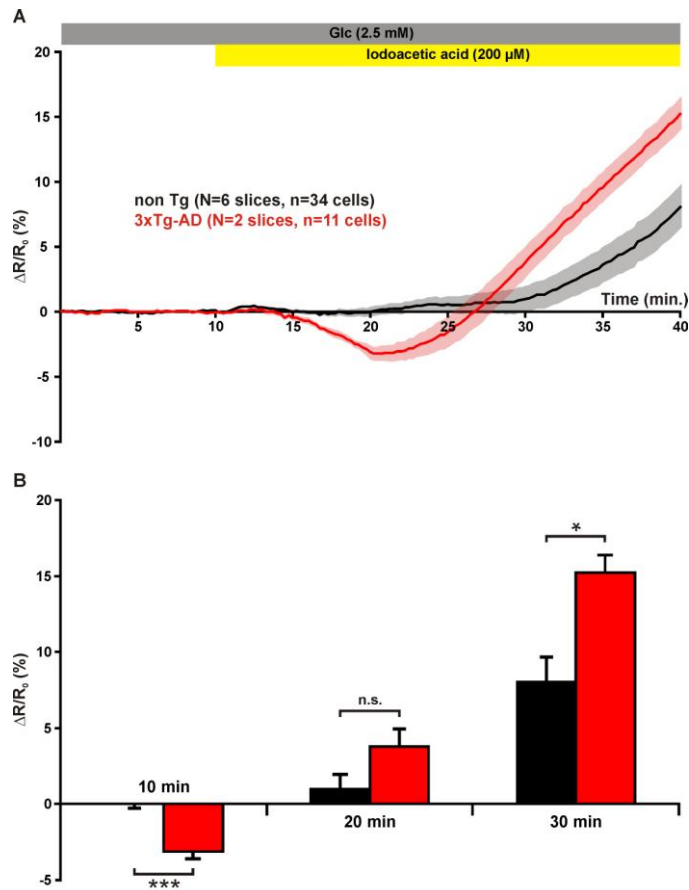


Figure 3: Blockade of glycolysis reveals differences in metabolic activity of layer II-III pyramidal cells.

(A) Mean relative YFP/CFP ratio changes in pyramidal cells of non Tg (black trace) and 3xTg-AD mice (red trace) induced by glycolysis inhibition with iodoacetic acid (200 μ M). Traces show means (solid lines) \pm standard errors of the mean (color shades). Note the early decrease in mean relative ratio during iodoacetic acid application followed by a late increase in pyramidal cells of 3xTg-AD mice. **(B)** Histograms show the metabolic activity (decrease in relative YFP/CFP ratio) at different time of glycolysis inhibition. After 10 min of iodoacetic acid application pyramidal cells of 3xTg-AD mice exhibit a transient increase in metabolic activity. Longer application reveals a larger impact of glycolysis inhibition in pyramidal cells of 3xTg-AD mice than in pyramidal cells of non Tg mice. *, *** statistically significant with $p < 0.05$ and 0.001 respectively. n.s. not statistically significant.

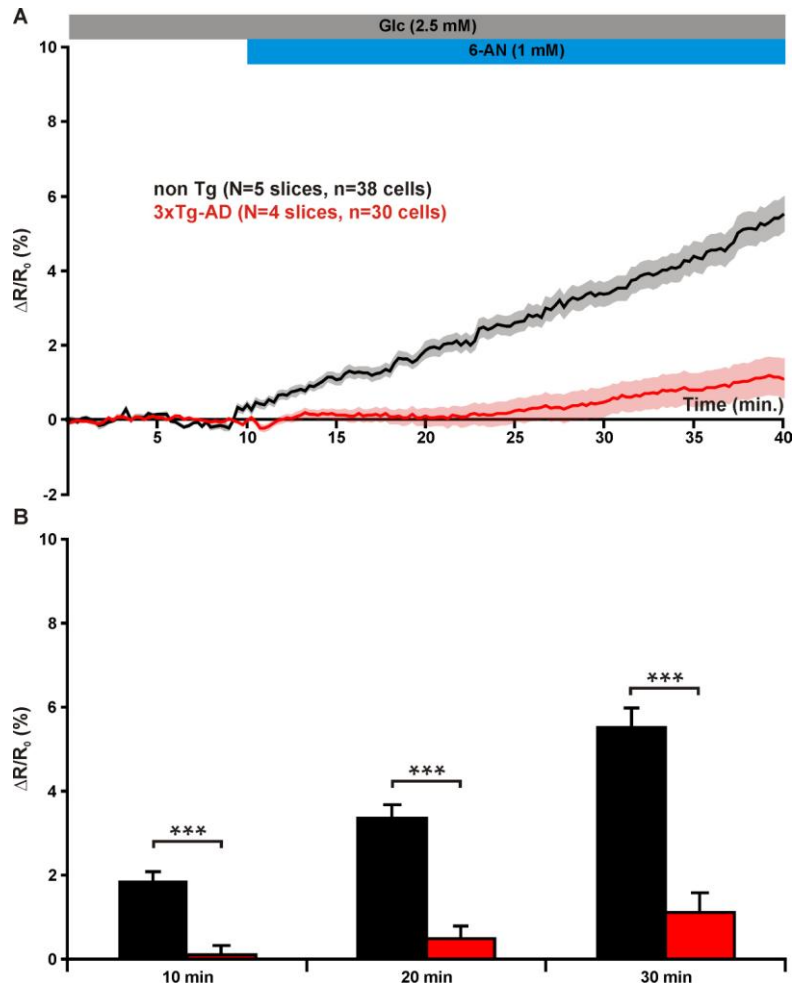


Figure 4: Blockade of the pentose phosphate pathway reveals differences in metabolic activity of layer II-III pyramidal cells.

(A) Mean relative YFP/CFP ratio changes in pyramidal cells of non Tg (black trace) and 3xTg-AD mice (red trace) induced by pentose phosphate pathway inhibition with 6-animonictotinamide (6-AN, 1 mM). Traces show means (solid lines) \pm standard errors of the mean (color shades). Note the slower increase in mean relative ratio during 6-AN application in pyramidal cells of 3xTg-AD mice.

(B) Histograms show the increase in intracellular glucose (increase in relative YFP/CFP ratio) at different time of pentose phosphate pathway inhibition. The mean increase in relative ratio is higher in pyramidal cells of non Tg mice at 10, 20 and 30 min of 6-AN superfusion. *** statistically significant with $p < 0.001$.

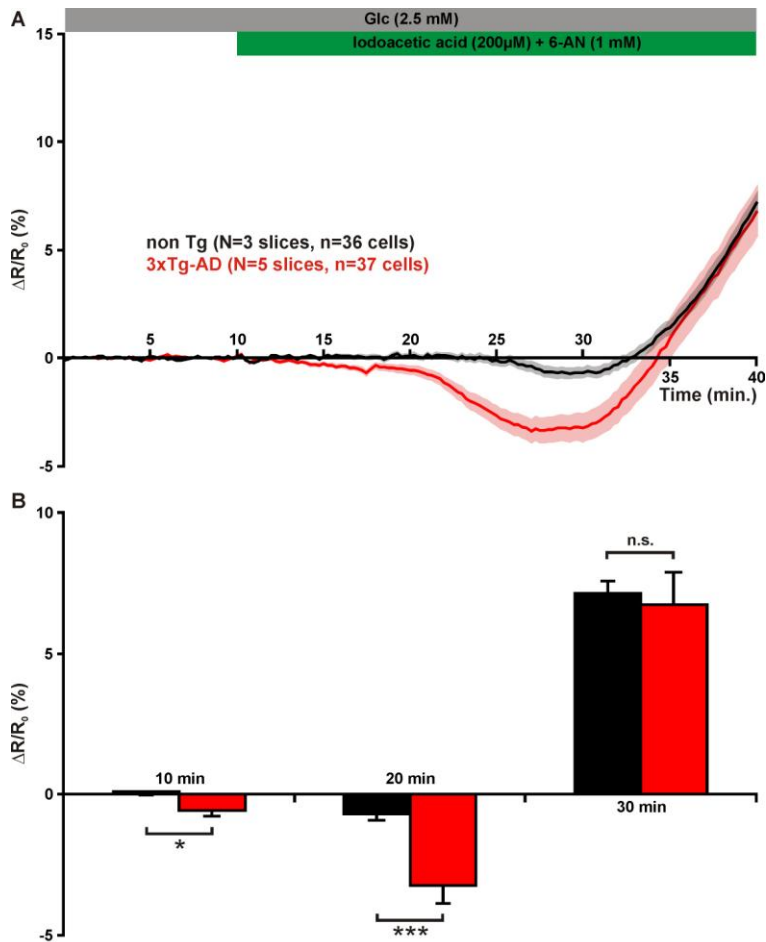


Figure 5: Combined blockade of the pentose phosphate pathway and glycolysis reveals a transient difference in metabolic activity of layer II-III pyramidal cells.

(A) Mean relative YFP/CFP ratio changes in pyramidal cells of non Tg (black trace) and 3xTg-AD mice (red trace) induced by pentose phosphate pathway and glycolysis inhibition with 6-animonictotinamide (6-AN, 1 mM) and iodoacetic acid (200 μ M). Traces show means (solid lines) \pm standard errors of the mean (color shades). Note the transient decrease in mean relative ratio during 6-AN and iodoacetic acid application in pyramidal cells of 3xTg-AD mice. **(B)** Histograms show the metabolic activity (decrease in relative YFP/CFP ratio) at different time of glycolysis inhibition. After 10 min and 20 min of combined iodoacetic acid and 6-AN application pyramidal cells of 3xTg-AD mice exhibit a transient increase in metabolic activity. Longer application reveals no significant difference between pyramidal cells of 3xTg-AD and non Tg mice. *, *** statistically significant with $p < 0.05$ and 0.001 respectively. n.s. not statistically significant.

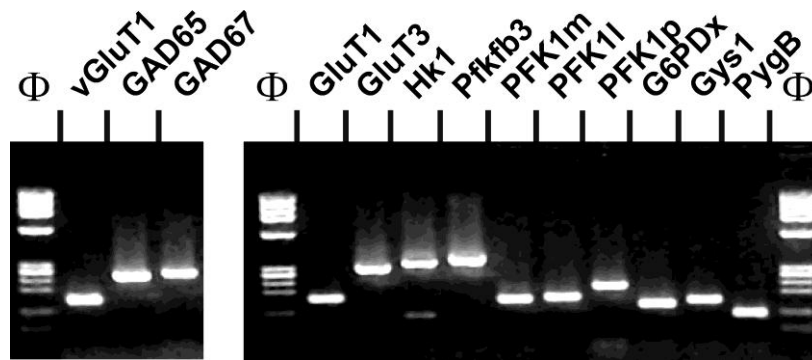


Figure 6: Sensitivity of the RT-mPCR.

Total whole brain RNAs (1 ng) were subjected to a RT-PCR protocol. The PCR products were resolved in separate lanes by agarose gel electrophoresis in parallel with λ x174 digested by *Hae*III as molecular marker and stained with ethidium bromide. The amplified fragments correspond to neuronal markers (left), glucose transporters and key enzymes of glucose metabolic pathways (right).

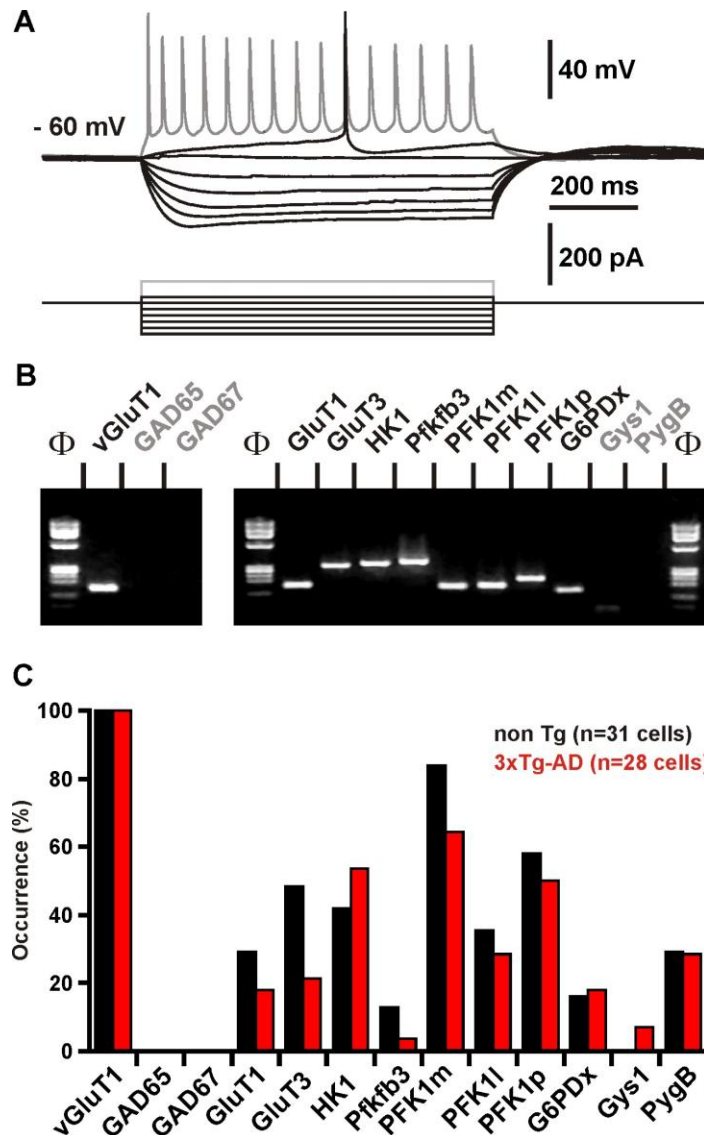


Figure 7: Characterization of key molecular elements of glucose metabolism in layer II-III pyramidal cells.

(A) Voltage responses (upper traces) induced by injection of current pulses (bottom traces) in a non Tg layer II-III pyramidal cell. In response to just-above-threshold current pulse, this neuron fired an action potential with a long lasting biphasic AHP (middle trace). Near saturation it showed the typical firing of a regular spiking neuron with marked frequency adaptation and spike amplitude accommodation (shaded trace). **(B)** The pyramidal cell shown in **(A)** expressed vGluT1, GluT1, GluT3, HK1, pfkfb3, PFK1m, PFK1l, PFK1p, and G6PDx. **(C)** Histograms showing the expression profiles of key molecular elements of glucose metabolism in layer II-III pyramidal cells of non Tg (black) and 3xTg-AD mice (red). No statistically significant difference in the occurrence of genes was observed between in pyramidal cells of non Tg and 3xTg-AD mice. Note the very low occurrence of pfkfb3 and Gys1 (glycogen synthase) in pyramidal neurons.

References

- Allaman I, Gavillet M, Belanger M, Laroche T, Viertl D, Lashuel HA, Magistretti PJ (2010) Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J Neurosci* 30:3326-3338.
- Almeida A, Moncada S, Bolanos JP (2004) Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 6:45-51.
- Ascoli GA, et al. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Belanger M, Yang J, Petit JM, Laroche T, Magistretti PJ, Allaman I (2011) Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *J Neurosci* 31:18338-18352.
- Bigl M, Apelt J, Eschrich K, Schliebs R (2003) Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *J Neural Transm* 110:77-94.
- Bilger A, Nehlig A (1992) Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. II. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Int J Dev Neurosci* 10:143-152.
- Bittner CX, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Gutierrez R, Cordova A, Valdebenito R, Frommer WB, Barros LF (2010) High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics* 2.
- Bolanos JP, gado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A (2008) Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. *Biochim Biophys Acta* 1777:789-793.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.
- Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O (2008) Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321:1686-1689.
- Buse MG (2006) Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E1-E8.
- Cabezas C, Irinopoulou T, Cauli B, Poncer JC (2013) Molecular and functional characterization of GAD67-expressing, newborn granule cells in mouse dentate gyrus. *Front Neural Circuits* 7:60.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28:264-278.
- Carroll JC, Rosario ER, Kreimer S, Villamagna A, Gentzsch E, Stanczyk FZ, Pike CJ (2010) Sex differences in beta-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res* 1366:233-245.

- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17:3894-3906.
- Chen Y, Tian Z, Liang Z, Sun S, Dai CL, Lee MH, LaFerla FM, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2012) Brain Gene Expression of a Sporadic (icv-STZ Mouse) and a Familial Mouse Model (3xTg-AD Mouse) of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 7:e51432.
- Chuquet J, Quilichini P, Nimchinsky EA, Buzsaki G (2010) Predominant Enhancement of Glucose Uptake in Astrocytes versus Neurons during Activation of the Somatosensory Cortex. *J Neurosci* 30:15298-15303.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM (2005) Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48:913-922.
- Coerver KA, Gray SM, Barnes JE, Armstrong DL, McCabe ER (1998) Developmental expression of hexokinase 1 and 3 in rats. *Histochem Cell Biol* 109:75-86.
- Cunningham MO, Pervouchine DD, Racca C, Kopell NJ, Davies CH, Jones RS, Traub RD, Whittington MA (2006) Neuronal metabolism governs cortical network response state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5597-5601.
- Deuschle K, Okumoto S, Fehr M, Looger LL, Kozhukh L, Frommer WB (2005) Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci* 14:2304-2314.
- Ding F, Yao J, Rettberg JR, Chen S, Brinton RD (2013) Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for bioenergetic intervention. *PLoS ONE* 8:e79977.
- Dotz HU, Zieglgansberger W (1998) Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared videomicroscopy. *Histochem J* 30:141-152.
- Dolev I, Fogel H, Milshtein H, Berdichevsky Y, Lipstein N, Brose N, Gazit N, Slutsky I (2013) Spike bursts increase amyloid-beta 40/42 ratio by inducing a presenilin-1 conformational change. *Nat Neurosci* 16:587-595.
- Drobac E, Tricoire L, Chaffotte AF, Guiot E, Lambolez B (2010) Calcium imaging in single neurons from brain slices using bioluminescent reporters. *J Neurosci Res* 88:695-711.
- Dubois B, et al. (2016) Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* 12:292-323.
- Fields HM, Rinaman L, Devaskar SU (1999) Distribution of glucose transporter isoform-3 and hexokinase I in the postnatal murine brain. *Brain Res* 846:260-264.
- Gatta E, Lefebvre T, Gaetani S, dos SM, Marrocco J, Mir AM, Cassano T, Maccari S, Nicoletti F, Mairesse J (2016) Evidence for an imbalance between tau O-GlcNAcylation and phosphorylation in the hippocampus of a mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Res* 105:186-197.
- Goren N, Manzano A, Riera L, Ambrosio S, Ventura F, Bartrons R (2000) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expression in rat brain during development. *Brain Res Mol Brain Res* 75:138-142.

- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hepp R, Tricoire L, Hu E, Gervasi N, Paupardin-Tritsch D, Lambolez B, Vincent P (2007) Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *J Neurochem* 102:1875-1886.
- Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, Bolanos JP (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 11:747-752.
- Hu E, Demmou L, Cauli B, Gallopin T, Geoffroy H, Harris-Warrick RM, Paupardin-Tritsch D, Lambolez B, Vincent P, Hepp R (2011) VIP, CRF, and PACAP Act at Distinct Receptors to Elicit Different cAMP/PKA Dynamics in the Neocortex. *Cereb Cortex* 21:708-718.
- Ivanov AI, Malkov AE, Waseem T, Mukhtarov M, Buldakova S, Gubkina O, Zilberter M, Zilberter Y (2014) Glycolysis and oxidative phosphorylation in neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:397-407.
- John SA, Ottolia M, Weiss JN, Ribalet B (2008) Dynamic modulation of intracellular glucose imaged in single cells using a FRET-based glucose nanosensor. *Pflugers Arch* 456:307-322.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23:1-10.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937.
- Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B (2009) Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci* 29:3642-3659.
- Khan JY, Rajakumar RA, McKnight RA, Devaskar UP, Devaskar SU (1999) Developmental regulation of genes mediating murine brain glucose uptake. *Am J Physiol* 276:R892-R900.
- Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreiros N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA, Hillman EM, Tegeder I, Murphy TH, Hamel E, Cauli B (2015) COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *J Neurosci* 35:11791-11810.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9:247-258.
- Lecrux C, Toussay X, Kocharyan A, Fernandes P, Neupane S, Levesque M, Plaisier F, Shmuel A, Cauli B, Hamel E (2011) Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J Neurosci* 31:9836-9847.
- Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2009) Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1820-1832.
- McCall AL, Van Bueren AM, Moholt-Siebert M, Cherry NJ, Woodward WR (1994) Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain. *Brain Res* 659:292-297.

- McEwen BS, Reagan LP (2004) Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 490:13-24.
- Mhaskar Y, Armour G, Dunaway G (2000) Alteration of the levels of the M-type 6-phosphofructo-1-kinase mRNA isoforms during neonatal maturation of heart, brain and muscle. *Mol Cell Biochem* 214:81-87.
- Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, Seino S (2001) ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4:507-512.
- Mosconi L (2005) Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:486-510.
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De SS, de Leon MJ (2010) Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J Alzheimers Dis* 20:843-854.
- Nagamatsu S, Kornhauser JM, Burant CF, Seino S, Mayo KE, Bell GI (1992) Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem* 267:467-472.
- Nehlig A (1999) Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 37:211-221.
- Nicholson RM, Kusne Y, Nowak LA, LaFerla FM, Reiman EM, Valla J (2010) Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain Res* 1347:179-185.
- Ninfali P, Aluigi G, Pompella A (1998) Postnatal expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different brain areas. *Neurochem Res* 23:1197-1204.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Sancheti H, Kanamori K, Patil I, Diaz BR, Ross BD, Cadenas E (2014a) Reversal of metabolic deficits by lipoic acid in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a ¹³C NMR study. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:288-296.
- Sancheti H, Patil I, Kanamori K, Diaz BR, Zhang W, Lin AL, Cadenas E (2014b) Hypermetabolic state in the 7-month-old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease and the effect of lipoic acid: a C-NMR study. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Schmidt MM, Dringen R (2009) Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front Neuroenergetics* 1:1.
- Silver IA, Erecinska M (1994) Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci* 14:5068-5076.
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1766-1791.

- Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Barrio JR, Phelps ME (2000) Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6037-6042.
- Surin AM, Khiroug S, Gorbacheva LR, Khodorov BI, Pinelis VG, Khiroug L (2012) Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. *Front Mol Neurosci* 5:102.
- Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB (2008) GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta* 1778:1091-1099.
- Tasic B, et al. (2016) Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*.
- Thevenaz P, Ruttimann UE, Unser M (1998) A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process* 7:27-41.
- Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME (2010) Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Vannucci SJ, Simpson IA (2003) Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1127-E1134.
- Vaughn AE, Deshmukh M (2008) Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 10:1477-1483.
- Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Valles J, Garcia-Fojeda B, Criado-Garcia O, Fernandez-Sanchez E, Medrano-Fernandez I, Dominguez J, Garcia-Rocha M, Soriano E, Rodriguez de CS, Guinovart JJ (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* 10:1407-1413.
- Vlassenko AG, Vaishnavi SN, Couture L, Sacco D, Shannon BJ, Mach RH, Morris JC, Raichle ME, Mintun MA (2010) Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Wilkin GP, Wilson JE (1977) Localization of hexokinase in neural tissue: light microscopic studies with immunofluorescence and histochemical procedures. *J Neurochem* 29:1039-1051.
- Winkler EA, Nishida Y, Sagare AP, Rege SV, Bell RD, Perlmutter D, Sengillo JD, Hillman S, Kong P, Nelson AR, Sullivan JS, Zhao Z, Meiselman HJ, Wenby RB, Soto J, Abel ED, Makshanoff J, Zuniga E, De V, Zlokovic BV (2015) GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat Neurosci*.
- Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Aiba A, Yonekura H, Kato N (2011) Suppression of a neocortical potassium channel activity by intracellular amyloid- β and its rescue with Homer1a. *J Neurosci* 31:11100-11109.
- Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, Mobbs CV (1999) Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48:1763-1772.

Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14670-14675.

Zeitschel U, Bigl M, Eschrich K, Bigl V (1996) Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase isoenzymes in rat brain. *J Neurochem* 67:2573-2580.

Discussion

L'altération précoce du métabolisme du glucose est une caractéristique fonctionnelle invariante de la MA. La rétention du glucose cérébral visualisée par FDG-TEP est fortement diminuée chez les patients (Cunnane et al., 2011) ainsi que dans de nombreux modèles murins de la MA (Nicholson et al., 2010 ; Niwa et al., 2002) et est utilisée chez l'humain pour prédire la progression de MCI vers MA (Reiman et al., 1996 ; Small et al., 1995a).

Le métabolisme du glucose dépend à la fois de son transport dans les cellules et de son oxydation au sein des voies intracellulaires. Or, les études d'imagerie basées sur le FDG-TEP ne permettent pas de faire la distinction entre les deux processus. De plus, cette technique apporte une vision globale du métabolisme cérébral mais n'autorise pas la distinction entre les différents types cellulaires qui le composent.

Notre étude a permis de mettre à jour une altération du métabolisme du glucose dans les cellules pyramidales corticales d'un modèle murin de la MA à un stade asymptomatique juvénile. Les données d'imagerie cellulaire ont mis en évidence une réponse métabolique différentielle des cellules pyramidales de souris 3xTg-AD et de souris non Tg. Cette différence ne serait pas due à une altération du transport neuronal du glucose mais à une augmentation du flux glycolytique associée à une diminution de l'activité de la voie des PPP⁹² dans les neurones des souris 3xTg-AD.

A. Le métabolisme du glucose est progressivement altéré dans la MA

1. Transport du glucose

Une forte réduction des transporteurs du glucose a été démontrée chez les patients de la MA. Cette diminution affecte aussi bien les isoformes endothéliales et astrocytaires de GluT1 (Kalaria and Harik, 1989a, 1989b) que l'isoforme neuronale GluT3 (Harr et al., 1995 ; Simpson et al., 1994). La réduction de GluT3 est particulièrement importante dans les cortex pariétal, occipital, temporal ainsi que dans l'hippocampe (Simpson et al., 1994), indépendamment des pertes neuronales liées à la pathologie (Simpson et al., 2008). De plus,

⁹² PPP : *Pentoses Phosphate Pathway*

la diminution significative de GluT1 n'est pas associée à une réduction de la quantité d'ARNm (Mooradian et al., 1997). Jusqu'à présent, aucun lien n'a été prouvé entre l'altération du transport du glucose et la progression de la pathologie.

Une diminution de GluT1 associée à une atrophie de l'hippocampe a été rapportée dans le modèle des souris APP/PS1 de 18 mois et se corrèle avec une forte charge amyloïde (Hooijmans et al., 2007). De la même façon, des altérations dans l'expression de GluT1 ont été rapportées à 12 mois chez la souris 3xTg-AD, en association à une augmentation des dépôts A β (Ding et al., 2013).

Nos données d'imagerie n'ont détecté aucune altération du transport du glucose dans les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD juvéniles. L'analyse moléculaire par scRT-PCR⁹³ va dans ce sens puisqu'aucune différence significative dans les profils d'expression des gènes liés au transport du glucose n'a été mise à jour.

L'ensemble de ces travaux laissent à penser que la réduction des GluTs interviendrait plus tardivement dans la pathologie de la MA sous l'effet d'une régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle dépendante de l'accumulation amyloïde.

2. Activité glycolytique

L'imagerie dynamique du glucose nous a permis de mettre à jour une plus forte activité glycolytique dans les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD que dans celles des souris non Tg. Cependant, aucune modification du profil d'expression des enzymes liées à la glycolyse n'a été détectée par scRT-PCR.

Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui rapportent une augmentation du flux glycolytique chez les souris 3xTg-AD adultes (Sancheti et al., 2014). La présence de ce phénomène chez des souris juvéniles asymptomatiques confirme une dérégulation extrêmement précoce du métabolisme du glucose (Yao et al., 2009).

⁹³ scRT-PCR : *single cell Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

L'activité de la PFK⁹⁴ déterminée dans le néocortex de patients ne semble pas être altérée par rapport aux sujets contrôles (Sims et al., 1987). En revanche, une diminution de l'activité de l'HK⁹⁵ a été démontrée dès 6 mois chez la souris 3xTg-AD sans que le niveau d'expression de l'enzyme ne soit altéré (Ding et al., 2013). L'HK étant enzyme cinétiquement limitante de la glycolyse, elle serait une cible parfaite pour réguler le flux glycolytique.

De récents travaux menés sur des cellules en culture indiquent que l'activité glycolytique est fortement augmentée lorsque le métabolisme mitochondrial est inhibé (Liemburg-Apers et al., 2015), or, celui-ci se trouve être fortement altéré dans la MA (Atamna and Frey, 2007; Devi et al., 2006) et dans les modèles murins de la maladie (Caspersen et al., 2005).

3. Phosphorylation oxydante

La diminution de l'activité des enzymes mitochondriales du cycle de Krebs est une manifestation majeure dans la MA.

Les activités de la PDH⁹⁶, qui catalysent la décarboxylation du pyruvate et de la KGDH⁹⁷, enzyme cinétiquement limitante du cycle, sont significativement réduites dans le cerveau des patients souffrants de la MA (Butterworth and Besnard, 1990 ; Gibson et al., 1988). La quantité de PDH serait également plus faible (Mastrogiacoma et al., 1996 ; Sheu et al., 1985).

Des déficits au niveau de la chaîne respiratoire sont également rapportés par de nombreux groupes. L'activité de la cytochrome c oxydase, entre autres, serait sévèrement affectée dans le cerveau des patients atteints de la MA (Hirai et al., 2001 ; Parker et al., 1994 ; Parker and

⁹⁴ PFK : PhosphoFructoKinase

⁹⁵ HK : HexoKinase

⁹⁶ PDH : Pyruvate DesHydrogénase

⁹⁷ KGDH : *alpha-KetoGlutarate DeHydrogenase Complex*

Parks, 1995) malgré une apparente intégrité de l'ADN codant pour les complexes de la chaîne respiratoire (Reichmann et al., 1993).

Une étude réalisée chez des souris 3xTg-AD adultes a fait valoir une diminution de la respiration mitochondriale ainsi qu'une plus faible activité de la PDH. Fait remarquable, des dysfonctions mitochondriales sont également détectées dans des cultures primaires de neurones embryonnaires, renforçant l'hypothèse d'un lien entre altération précoce de la phosphorylation oxydante et développement de la pathologie (Yao et al., 2009).

Les altérations de la phosphorylation oxydante mitochondriale associées plus tardivement à un transport du glucose défectueux pourraient expliquer l'hypométabolisme observé par FDG-TEP chez les patients de la MA (Shoffner, 1997; Yao et al., 2009).

L'activation de la glycolyse observée dans les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD juvéniles pourrait être un mécanisme de compensation à la réduction de la production d'ATP mitochondriale, permettant de soutenir la demande énergétique neuronale.

4. Stress glycatif

Dans des neurones en condition normale, une glycolyse excessive est pro-apoptotique (Herrero-Mendez et al., 2009). Ceci est en partie dû au fait qu'une forte glycolyse favorise la production de réactifs oxydants. En effet, l'augmentation du G3P, un intermédiaire de la glycolyse, renforce la production de méthylglyoxal (voir Chen and Zhong, 2013 pour revue). Ce dernier mène à la formation des composés de glycation avancée (AGEs⁹⁸) causant de nombreux dégâts cellulaires (Bélanger et al., 2011 ; Thornalley, 1996) et un stress oxydant important (Amicarelli et al., 2003 ; Kikuchi et al., 1999 ; Shinpo et al., 2000 ; Thornalley, 2005).

La production des AGEs augmente fortement dans les neurones au cours du vieillissement normal et de façon encore plus prononcée dans le cerveau des malades (Münch et al., 2002 ; Smith et al., 1994 pour revue). L'accumulation se fait aussi bien dans les neurones que dans

⁹⁸ AGEs : *Advanced Glycation End Products*

les cellules astrogliales et peut être associée aux plaques neuritiques et aux NFTs (Castellani et al., 2001 ; Chen et al., 2006 ; Fawver et al., 2012 ; Lüth et al., 2005).

L'accumulation des AGEs conduit à la fois à une réticulation des protéines (A β et MAP-Tau entre autres) et à un stress oxydant pouvant contribuer à la vulnérabilité et exacerber les dysfonctions neuronales dans la MA (Münch et al., 1997).

Des travaux menés sur des cellules en culture ont fait ressortir le rôle des AGEs dans l'accélération des dépôts amyloïdes (Vitek et al., 1994) suggérant que ce processus renforce l'amyloïdose au cours du développement de la pathologie.

L'augmentation du flux glycolytique telle que nous l'avons observée dans les cellules pyramidales de souris 3xTg-AD pourrait donc à terme conduire à accroître le stress oxydant dans le cerveau vieillissant.

5. Stress oxydant

Bien qu'il augmente naturellement avec le vieillissement normal des individus (Beckman and Ames, 1998 ; Sanz et al., 2006) et des animaux modèles (Driver et al., 2000), le stress oxydant est intensifié en conditions pathologiques (Marcus et al., 1998). Une importante oxydation des lipides (Praticò et al., 1998, p. 2 ; Sayre et al., 1997), des protéines (Smith et al., 1991) et des acides nucléiques (Simpson, 1992) a été exposée chez les patients de la MA.

Ces phénomènes apparaissent bien avant les plaques et les NFTs dans les modèles murins de la maladie (David et al., 2005 ; Schuessel et al., 2005). Ainsi, chez les souris 3xTg-AD, l'augmentation du stress oxydant se manifeste par une production accrue de peroxyde d'hydrogène et de lipides peroxydés dès 3 mois (Yao et al., 2009).

Le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogenèse de la MA et pourrait renforcer les perturbations du métabolisme mitochondrial observées dans la pathologie (Reddy and Beal, 2008).

6. Voie des PPP

Dans le cerveau, la PPP joue un rôle anti-inflammatoire et neuro-protecteur majeur. (García-Nogales et al., 1999 ; Vaughn and Deshmukh, 2008). Le NADPH qu'elle génère permet le recyclage du glutathion (GSH) qui, lorsqu'il est sous sa forme réduite, assure l'élimination des dérivés réactifs de l'oxygène (Bolaños and Almeida, 2010). Cette voie est primordiale dans la prévention contre le stress oxydant et glycatif.

L'altération de la voie des PPP dans la MA a été soulignée par des recherches antérieures. La transkétolase, enzyme cinétiquement limitante de la branche non oxydative de la PPP, joue un rôle critique dans l'échange des métabolites entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates (Gibson and Blass, 2007). Des biopsies *post-mortem* de tissus corticaux ont révélé que cette enzyme était significativement altérée dans le cortex temporal des patients de la MA (Butterworth and Besnard, 1990; Gibson et al., 1988).

La G6PDH est l'enzyme limitante de la PPP. Elle joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre redox en fournissant des équivalents réducteurs au glutathion. Une étude immunohistochimique a souligné une régulation positive de la G6PDH dans le cerveau des patients de la MA. Les auteurs suggèrent qu'il s'agit là d'une compensation mise en place pour combattre le stress oxydant et glycatif accru dans la maladie (Russell et al., 1999).

Dans notre étude par imagerie FRET, l'inhibition de la voie des pentoses phosphates (PPP) par le 6-AN souligne une réduction significative de la voie des PPP dans les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD juvéniles. Une hypothèse serait que le renforcement du flux glycolytique mis en évidence dans ces cellules se fasse au détriment de la PPP.

Nos données suggèrent une diminution très précoce des moyens de défense des neurones contre le stress oxydant et le stress glycatif exacerbés très tôt dans la pathologie. Ces

facteurs pourraient avoir des conséquences néfastes sur la viabilité des neurones sur le long terme.

B. Il existe des interactions entre altérations métaboliques, peptides A β et protéines Tau

1. Déficits métaboliques et A β

Le fait qu'il n'existe pas de corrélation spatiale claire entre la rétention du PiB⁹⁹ (utilisé pour imager la charge amyloïde *in vivo*) et la rétention du FDG¹⁰⁰ dans le cortex des patients consolide l'hypothèse que les dépôts amyloïdes ne sont pas déterminants dans les changements métaboliques du glucose (Berti et al., 2010).

De la même manière, une diminution de l'utilisation du glucose a été démontrée chez de jeunes souris transgéniques APP à un stade où les plaques amyloïdes ne sont pas encore déposées (Niwa et al., 2002).

Le fait que l'application d'A β réduise le métabolisme du glucose dans des souris saines (Niwa et al., 2000) a contribué à l'hypothèse que l'A β soluble et non les plaques pourrait être à l'origine de l'altération du métabolisme énergétique.

De récentes données vont dans ce sens et suggèrent que le transporteur endothélial du glucose GLUT1 serait une cible moléculaire par laquelle A β exercerait un effet délétère sur le métabolisme (Winkler et al., 2015).

Dans le cadre de la MA, la dérégulation de la bioénergétique mitochondriale se met en place bien avant l'apparition des premières plaques séniles et des symptômes cliniques (voir Hirai et al., 2001 pour revue). De nombreuses études montrent que ces dysfonctions sont associées à une forte charge amyloïde au sein même de la mitochondrie dans le cerveau des patients comme chez les souris modèles. Cette accumulation intramitochondriale

⁹⁹ PiB : *Pittsburg compound B*

¹⁰⁰ FDG : *Fluoro-Deoxy-Glucose*

précéderait l'accumulation extracellulaire et augmenterait avec l'âge chez les patients de la MA et dans les modèles murins (Devi et al., 2006 ; Du et al., 2008 ; Manczak et al., 2006).

Des travaux réalisés sur culture primaire de cellules neuronales et non neuronales confirment que les oligomères solubles d'A β déstabilisent considérablement les fonctions métaboliques de la mitochondrie (Cardoso et al., 2001 ; Kaneko et al., 1995).

Le métabolisme astrocytaire est également perturbé par l'A β qui provoque une altération de leurs flux calciques intracellulaires et de la production d'antioxydants (Abramov et al., 2003). Ainsi, l'accumulation d'A β dans le cerveau pourrait directement participer à la détérioration de la phosphorylation oxydante et favoriser le stress oxydant. Il reste à élucider les mécanismes conduisant à ces dérégulations.

Un lien direct entre la toxicité induite par l'A β et ces dérégulations a été suggéré par l'interaction entre l'A β et les protéines mitochondriales ABAD¹⁰¹. Cette interaction distordrait la structure enzymatique des protéines provoquant leur inactivation et favoriserait la genèse de radicaux libres (Lustbader et al., 2004 ; Yan and Stern, 2005).

Dans le cerveau des souris 3xTg-AD, le niveau de peptide A β mitochondrial augmente significativement à 9 mois et corrèle avec un plus fort niveau d'ABAD. En revanche, le déclin de l'activité énergétique débute bien avant (chez des souris âgées de 3 mois), laissant penser que d'autres mécanismes interviennent en amont. De plus, il semblerait qu'une diminution du métabolisme énergétique associée à une augmentation du stress oxydant contribue à la surproduction d'A β (Frederikse et al., 1996). Un cercle vicieux se mettrait ainsi en place, renforçant la production d'A β et de ROS.

Notre étude sur les cellules pyramidales corticales de souris 3xTg-AD juvéniles a révélé des altérations métaboliques à un âge où aucun dépôt de peptide A β n'est observé, attestant le lien possible entre accumulation du peptide et déficits métaboliques.

¹⁰¹ ABAD : *Amyloid Beta peptide Alcool Dehydrogenase*

Ainsi, la toxicité de l'A β s'exercerait sur de multiples cibles et pourrait conduire à une dérégulation métabolique. Un métabolisme cérébral défectueux risquerait, quant à lui, de renforcer les effets délétères du peptide voire même d'initier son accumulation.

2. Déficiets métaboliques et hyperphosphorylation de la protéine Tau

La O-N-acétylglucosamination est une réaction biochimique permettant de moduler dynamiquement les protéines cytoplasmiques et nucléaires par une modification du fragment hydroxyle de leurs acides aminés sérine et thréonine. Elle est catalysée par la O-GlcNac¹⁰² et nécessite environ 2% à 5% de l'énergie fournie par la phosphorylation oxydante.

La O-N-acétylglucosamination maintiendrait la protéine Tau dans un faible état de phosphorylation, ce qui favoriserait son ancrage sur les microtubules et limiterait son agrégation (Liu et al., 2009).

Les niveaux de O-GlcNac sont significativement réduits dans le cortex des patients atteints de la MA par rapport à des personnes saines du même âge (Wang et al., 2016). De même, un déséquilibre entre phosphorylation et O-N-acétylglucosamination de la protéine Tau a été exposé dans les neurones corticaux des souris 3xTg-AD âgées de 12 mois (Gatta et al., 2016).

La délétion ciblée du gène codant pour la O-GlcNac dans le cortex basal de souris adultes entraîne une neurodégénérescence progressive, incluant une mort neuronale étendue, une neuro-inflammation, une augmentation de protéines Tau hyperphosphorylées et de peptides A β ainsi que des déficits mnésiques (Wang et al., 2016).

De plus, une diminution des transporteurs du glucose a pu être associée à une réduction de la O-N-acétylglucosamination de la protéine Tau et à sa plus forte phosphorylation (Liu et al., 2009).

¹⁰² O-GlcNac : *O-linked β -N-acetylglucosamine*

Ces données révèlent un lien direct entre métabolisme du glucose et O-GlcNAcylation et indiquent que ce dernier régule des voies critiques pour le maintien de l'intégrité neuronale. Son dysfonctionnement pourrait contribuer à la fois à la formation des NFTs et à la neurodégénérescence observée dans la MA.

Le fait que les données de scRT-PCR n'aient révélé aucune altération significative dans les profils d'expression des gènes liés au métabolisme du glucose laisse penser que l'interaction entre l'expression des transgènes et les altérations métaboliques observées dans les cellules pyramidales des souris 3xTg-AD s'exerce précocement au niveau post-transcriptionnel ou post-traductionnel.

C. Les déficits métaboliques affectent les fonctions neuronales

1. Métabolisme et dysfonctions synaptiques

Plusieurs pistes indiquent que des altérations précoces du métabolisme du glucose pourraient être à l'origine des dysfonctions synaptiques observées dans la MA.

L'activité de la GSK-3¹⁰³, enzyme impliquée dans la synthèse du glycogène, est significativement plus importante chez les patients souffrants de la MA que chez les individus sains du même âge (Blalock et al., 2004). Or, l'activation de cette enzyme provoquerait une réduction de la synthèse d'acétylcholine et favoriserait l'apoptose (Hoshi et al., 1996).

La GSK-3 serait également impliquée dans l'inhibition de la LTP¹⁰⁴, dans l'altération de la mémoire ainsi que dans la mise en place des processus inflammatoires associés à une activation microgliale (Chen and Zhong, 2013 ; Hooper et al., 2007, 2008).

¹⁰³ GSK-3 : *Glycogen Synthase Kinase - 3*

¹⁰⁴ LTP : *Long Term Potentiation*

Enfin, l'activation de la GSK-3 favoriserait l'accumulation de l'A β (Jaworski et al., 2011 ; Phiel et al., 2003) et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Cho and Johnson, 2003 ; Lovestone et al., 1994) ainsi que la formation des NFTs (Lucas et al., 2001).

Cette enzyme pourrait donc jouer un rôle direct dans les déficits synaptiques observés dans la MA et le développement des lésions associées à la pathologie.

Les mitochondries sont soumises à l'influence de nombreux facteurs agressifs comme les signaux externes d'apoptose, les surcharges calciques et le stress oxydant (Baloyannis, 2006; Bubber et al., 2005). Leur dégénérescence précoce pourrait être à l'origine d'un grand nombre de dérégulations synaptiques observées dans la MA telles que l'altération des flux calciques intracellulaires (Bernstein et al., 2005 ; Honarnejad et al., 2013 ; Jaworska et al., 2013) ou encore la stimulation des voies apoptotiques (Chan et al., 2002 ; Lloret et al., 2008 ; Tokarz et al., 2016).

L'excitotoxicité est un événement critique dans la MA (Hynd et al., 2004). Bien qu'il ait été montré que les oligomères A β pouvaient se lier aux récepteurs NMDA pour exercer un effet neurotoxique (Tominaga-Yoshino et al., 2001), une altération du métabolisme du glucose pourrait fortement contribuer à cette excitotoxicité en perturbant le recyclage du glutamate par les astrocytes.

Une étude confirme le lien entre A β , perturbation du métabolisme astrocytaire et mort neuronale (Abramov et al., 2003).

De façon plus générale, une diminution de la production d'ATP rendrait de plus en plus difficile le maintien de la communication neuronale (voir chapitre **I.A.2.** de l'**introduction**).

L'autophagie est impliquée dans l'élimination des protéines et des organites. Elle intervient dans la dégradation de l'amyloïde et pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de la MA (Jaeger et al., 2010). Ce processus est altéré chez les patients touchés par la MA (Ma et al., 2010 ; Pickford et al., 2008) et dans les modèles murins de la maladie (Yu et al., 2004).

Des souris dont le système d'autophagie est dérégulé présentent une neurodégénérescence (Hara et al., 2006) associée à une accumulation intracellulaire et extracellulaire d'A β (Cai et al., 2012 ; Yu et al., 2004). De nombreux liens entre altération du processus d'autophagie et la tauopathie ont également été mis en évidence (Hamano et al., 2008 ; Schaeffer et al., 2012 ; Wang et al., 2009).

Or, ce processus a un coût énergétique. Le métabolisme du glucose est important pour l'autophagie, en particulier via la O-N-acétylglucosamination (Wang and Hanover, 2013). Dans les astrocytes, l'autophagie est essentielle car elle permet, entre autres, la régénération du réseau mitochondrial (Motori et al., 2013). L'altération de ce processus pourrait donc renforcer les altérations métaboliques observées dans la maladie.

La perturbation du métabolisme du glucose pourrait donc être à l'origine de nombreux processus physiopathologiques associés à la MA.

2. Pourquoi certaines régions cérébrales sont-elles plus sévèrement affectées que d'autres ?

L'hypométabolisme du glucose révélé par FDG-TEP est spécifique de certaines régions corticales (en particulier les lobes temporaux et pariétaux corticaux). Si les altérations du métabolisme du glucose en général et du métabolisme mitochondrial en particulier sont des facteurs initiateurs du processus physiopathologique, pourquoi conduiraient-elles à une hétérogénéité régionale si marquée ?

Un premier élément de réponse peut être apporté par le fait que la demande énergétique est variable selon les différents types cellulaires. A ce titre, les neurones sont particulièrement énergivores. De plus, une variabilité de la demande énergétique peut subsister au sein de la population neuronale. Les neurones de projection ont une forte demande énergétique. Or, il semblerait que ceux-ci dégèrent le plus précocement dans les maladies neurodégénératives (Pacelli et al., 2015). A ce titre, il serait intéressant d'étudier le profil métabolique de types cellulaires spécifiques tels que les cellules pyramidales de projection ou encore les interneurons à projections longues à différents stades de la pathologie.

Une deuxième explication serait l'existence d'un métabolisme variable au sein des différentes régions cérébrales. Un article paru en 2010 a démontré qu'il existait une variation régionale de la glycolyse aérobie par rapport à la phosphorylation oxydante dans le cerveau humain (Vaishnavi et al., 2010). Ainsi, le DMN¹⁰⁵ qui regroupe des régions particulièrement actives lorsqu'un sujet est éveillé mais en état de repos, posséderait un métabolisme du glucose élevé chez les sujets sains (Silverman et al., 2001). Cependant, il se trouve que ces mêmes régions (dont le lobe temporal et médio préfrontal) sont plus fortement sujettes à la déposition amyloïde (Buckner et al., 2005 ; Vlassenko et al., 2010).

Conclusion

Le métabolisme du glucose fait intervenir un grand nombre de voies et d'acteurs cellulaires et subcellulaires. Parmi eux, la mitochondrie semble particulièrement vulnérable et présente des altérations très précoces dans le développement de la pathologie Alzheimer.

Les dysfonctions mitochondriales pourraient être critiques dans le développement des formes sporadiques de la MA comme le suppose le lien entre l'hypométabolisme cérébral et l'histoire familiale maternelle avec la maladie (Liang et al., 2008 ; Mosconi et al., 2009).

Une altération de la bioénergétique mitochondriale pourrait avoir des conséquences néfastes sur le long terme. Dans un premier temps, des mécanismes de compensations pourraient se mettre en place au sein même de la mitochondrie puis, à l'échelle cellulaire. L'augmentation de l'activité glycolytique permettrait par exemple de pallier la production défectueuse d'ATP par la phosphorylation oxydante. A terme, l'accumulation des perturbations, les effets secondaires des mécanismes compensateurs et les altérations liées au vieillissement normal, fragiliseraient les neurones et conduiraient aux déficits pathologiques associés à la maladie.

¹⁰⁵ DMN : *Default Mode Network*

Un très grand nombre de processus sont altérés dans la MA. Il est difficile de faire la part des choses entre perturbations initiales, systèmes de compensations et renforcement des altérations par un système d'engrenage. Dans tous les cas, il serait présomptueux de prétendre qu'une seule cause en soit à l'origine.

L'hypométabolisme du glucose pourrait générer de façon indépendante les caractéristiques anatomopathologiques de la MA incluant les plaques A β , l'hyperphosphorylation de la protéine Tau ainsi que les pertes synaptiques et neuronales. Si cette hypothèse est plausible pour les formes sporadiques, elle n'explique pas les formes familiales le plus souvent associées à des mutations dans les voies de la synthèse amyloïde.

L'intense travail de recherche effectué ces dernières décennies conduit à penser que les trois facteurs que sont l'accumulation de peptides A β , la fibrillation de la protéine Tau et le métabolisme déficient du glucose agiraient de concert (avec des contributions relatives variables). Ces trois facteurs assureraient la mise en place d'un grand nombre de cascades physiopathologiques amenant de façon synergique aux dysfonctions cérébrales associées à la MA. Ces cascades incluraient vraisemblablement les dysfonctions du métabolisme mitochondrial, l'augmentation du stress oxydant, les processus inflammatoires, l'excitotoxicité et les AGEs.

L'ensemble des points évoqués ici expliquerait en partie pourquoi les stratégies thérapeutiques visant à cibler un seul aspect de la pathologie se sont avérées peu efficaces. La prise en charge précoce des patients et la mise en place d'une thérapie multifactorielle semblent primordiales pour espérer parvenir à ralentir significativement le développement de la pathologie.

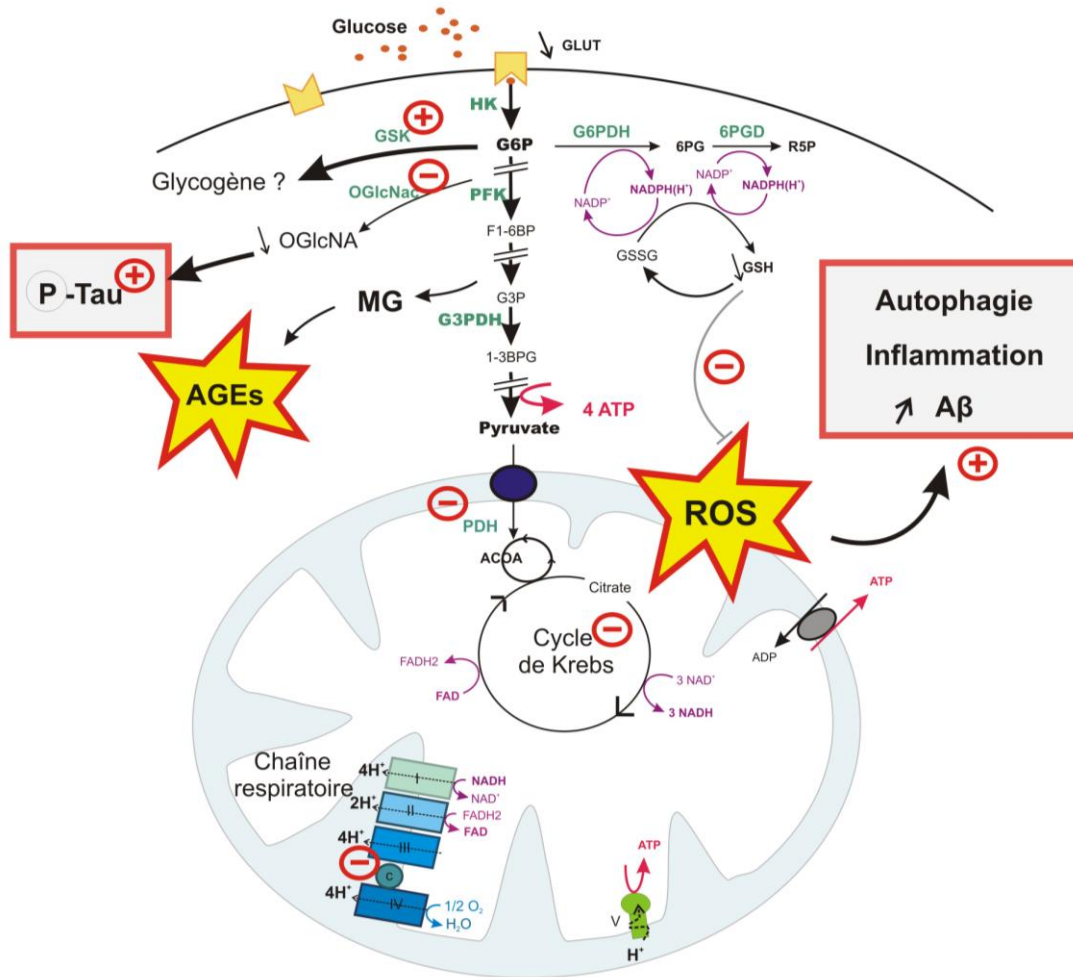


Schéma bilan : Altération du métabolisme du glucose neuronal dans la MA

En comparaison avec le métabolisme neuronal normal présenté dans le schéma bilan p.97 : Le nombre de **GlutTs** décroît progressivement au cours de la pathologie. La **GSK** présente une activité excessive. La mitochondrie est fortement affectée, l'efficacité du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire sont réduites et une quantité importante de **ROS** est produite. Le flux glycolytique serait rapidement renforcé pour pallier le déficit de la phosphorylation oxydante mais favoriserait la production de **MG** et de **AGEs** toxiques pour la cellule. En parallèle, une diminution de la voie des **PPP** et de la **OGlcNA** fragiliserait les neurones contre les stress glycatif et oxydant accrus et favoriserait la survenue des caractéristiques anatomopathologiques de la MA dont la phosphorylation de la protéine Tau, l'accumulation d'Aβ, les dérégulations des processus d'autophagie et l'inflammation sont des exemples. Les rôles des astrocytes, des cellules microgliales et de la BHE dans les altérations métaboliques liées à la MA ne sont pas représentés ici. Les enzymes sont indiquées en vert, les coenzymes en rose et les intermédiaires métaboliques en noir (se reporter à la liste p.16-17 pour les abréviations).

Partie 3 :

Contribution des récepteurs $\alpha 1$ et β noradrénergiques dans la modulation de l'excitabilité des cellules pyramidales corticales chez la souris

Introduction

La NA¹⁰⁶ (noradrénaline ou norépinéphrine) appartient à la famille des catécholamines, un ensemble de molécules comprenant à la fois des substances endogènes telles que la dopamine ou encore l'adrénaline mais également des composés synthétisés artificiellement comme l'isoprotérénol.

Les prémices de la recherche sur les CAT¹⁰⁷ débutent à la seconde moitié du 19^{ème} siècle, lorsque Claude Bernard met en évidence une régulation du tonus vasculaire par le système nerveux sympathique (Bernard C., 1878).

En 1864, Henry Hyde Salter écrit dans *the asthma book* que "la guérison de l'asthme par une violente émotion est plus soudaine et complète qu'aucun autre remède quel qu'il soit". Cette "guérison" instantanée sera plus tard associée à une libération d'adrénaline par les glandes surrénales.

Au début des années 1890, le pharmacologue allemand Johann Carl Jacobj montre que la stimulation des glandes surrénales abolit le péristaltisme intestinal induit par stimulation électrique du nerf vague (Jacobj 1892). Quelques années plus tard, Oliver et Schäfer découvrent les effets d'extraits de glandes surrénales sur le système cardiovasculaire et le concept d'hormones commence à émerger (Oliver et Schäfer 1894).

C'est en 1898, à Baltimore, qu'une CAT est partiellement purifiée pour la première fois. Le chimiste John Jacob Abel (Abel 1899) l'ayant obtenue à partir de glandes surrénales, il l'appelle épinéphrine. En 1900, au Japon, la même molécule est totalement purifiée et cristallisée par le chimiste Jokichi Takamine (Takamine 1901) qui l'appelle adrénaline.

Enfin en 1946, la noradrénaline (NA) est découverte par Ulf Svante Von Euler au niveau des nerfs périphériques avant d'être également mise en évidence dans le cerveau.

¹⁰⁶ NA : Noradrénaline

¹⁰⁷ CAT : Catécholamines

I. Physiologie de la noradrénaline dans le système nerveux central

Dans le système nerveux central, la NA tient le rôle de neurotransmetteur aux multiples fonctions, brièvement présentées ici. Sa découverte a joué un rôle majeur dans l'histoire de la physiologie.

A. La NA est impliquée dans de nombreuses fonctions cérébrales

1. Régulation du flux sanguin cérébral

Etant donné le rôle de l'adrénaline dans le contrôle de la distribution sanguine par le système sympathique, il n'est pas surprenant que la NA affecte le diamètre des vaisseaux (Mulligan and MacVicar, 2004 ; Peppiatt et al., 2006) et régule le flux sanguin dans le système nerveux central (Raichle et al., 1975). Une récente étude effectuée sur des rats a montré que la NA était importante pour optimiser la distribution du volume sanguin cérébral dans les régions activées grâce à un effet vasoconstricteur général associé à des vasodilatations locales qui optimiserait la distribution du sang aux zones actives (Bekar et al., 2012).

2. Réponse au stress

Le système noradrénergique est significativement et dynamiquement affecté par le stress (Cassens et al., 1980 ; Flügge et al., 2004). En condition de stress aigu, la NA augmente aussi bien dans le système nerveux central que périphérique (Abercrombie and Jacobs, 1987 ; Sands et al., 2000). Des dysfonctions du système noradrénergique ont été impliquées dans de nombreux troubles psychiatriques tels que l'anxiété ou la dépression, dont la plupart sont précipités par un stress chronique (Morilak and Frazer, 2004).

3. Eveil, attention et concentration

Le taux cérébral de NA baisse pendant le sommeil (Berridge et al., 2012) et atteint des niveaux très élevés en situation de danger ou en période de stress (Sara and Bouret, 2012). Des rats dont les projections noradrénergiques ascendantes ont été lésées présentent des déficits cognitifs (Mair et al., 2005) particulièrement marqués en condition d'excitation ou de tâche comportementale demandant une forte concentration (voir Robbins, 1997 pour revue et travaux antérieurs). Des études par imagerie TEP menée chez l'homme ont également montré que la NA affectait l'attention et la mémoire de travail en facilitant l'intégration fonctionnelle des régions impliquées dans ces processus. Ainsi, la NA augmente l'attention, permet la concentration et promeut la vigilance (Berridge et al., 2012).

4. Acuité sensorielle

Des études menées sur les neurones du cortex auditif du singe ont démontré que la NA induisait une diminution de l'activité spontanée des neurones mais renforçait la réponse évoquée par un signal auditif (Foote et al., 1975). De nombreuses études ont confirmé cet effet "facilitant" de la NA dans le cortex cérébral (Waterhouse and Woodward, 1980) ou l'hippocampe (Segal and Bloom, 1976) qui augmenterait ainsi le ratio signal sur bruit.

De plus, en présence d'un stimulus auditif particulier dans un environnement sonore, la NA favoriserait la perception précise dudit stimulus en inhibant les réponses induites par les fréquences sonores similaires et en augmentant sélectivement la réponse évoquée par le stimulus en question (Manunta and Edeline, 2004). Des observations similaires ont été faites dans le cortex visuel chez le rat (Hurley et al., 2004). Ceci suggère que lorsque l'attention est forte, le système auditif est plus sélectif ou plus finement mis au point.

Plusieurs équipes ont également montré le rôle de la NA dans l'amélioration de la rythmicité et de la synchronisation des décharges neuronales, par exemple au niveau du cortex piriforme en réponse à des stimulations olfactives (Bouret and Sara, 2002) ou encore

dans le cortex somatosensoriel après stimulation tactile (Lecas, 2004). Connaissant l'importance de la précision temporelle des décharges de PA dans l'encodage d'un stimulus (Dan and Poo, 2006 ; Lestienne, 2001), il semble que l'acuité de la perception sensorielle serait facilitée par la NA.

5. Formation de la mémoire, sa consolidation et sa rétention

Des études comportementales ont été réalisées chez le rat. Après que celui-ci ait mémorisé une nouvelle tâche comportementale (i.e. pendant la période de consolidation), l'utilisation de composés pharmacologiques altérant la transmission noradrénergique a provoqué une altération de la mémorisation. Les auteurs concluent que la NA interagit avec d'autres neuromodulateurs pour favoriser la formation de la mémoire à long terme (voir (McGaugh and Roozendaal, 2009) pour revue). De nombreuses études ont depuis confirmé le fait que la NA stimulait la formation et la consolidation de la mémoire (Ferry et al., 1999 ; Murchison et al., 2004).

B. La production de la NA est assurée par des groupes de neurones formant des noyaux

1. Les noyaux noradrénergiques sont localisés au niveau du tronc cérébral

Dans le cerveau, la NA est produite par un petit nombre de neurones aux propriétés morphologiques et anatomiques spécifiques. Les neurones noradrénergiques projettent vers la plupart des aires cérébrales grâce à leur arborisation axonale extrêmement ramifiée (**Figure 42**). Ils présentent un grand nombre de collatérales et des centaines de terminaisons leur permettant de libérer la NA de façon synaptique et extra-synaptique (Kvetnansky et al., 2009).

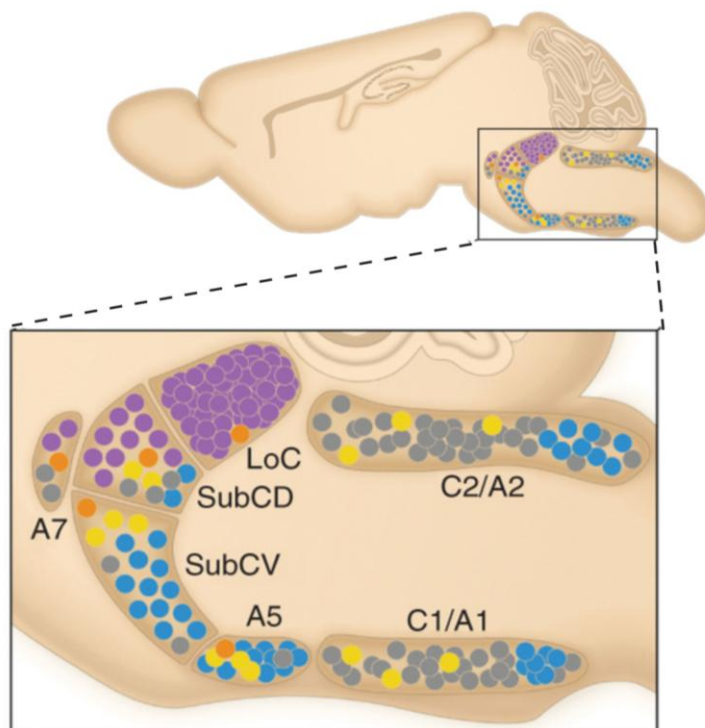


Figure 41 : Localisation des noyaux noradrénergiques du système nerveux central

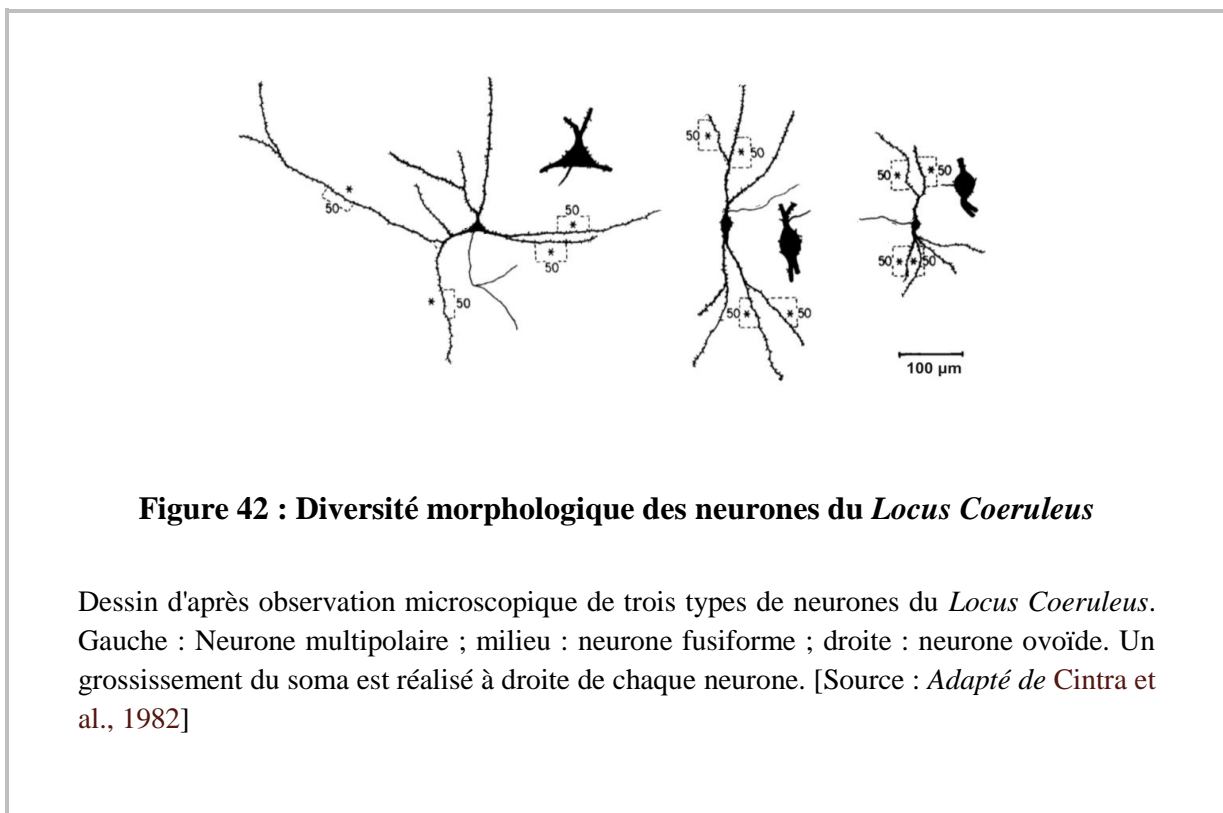
Vue sagittale schématisée d'un cerveau de rongeur. Les noyaux noradrénergiques sont désignés **LoC**, **SubC**, **A7**, **A5**, **A2** et **A1** en référence à l'atlas stéréotaxique établi par Paxinos et Franklin (Paxinos and Franklin, 2004). Le code couleur correspond à l'origine embryonnaire de chaque population neuronale. Le *Locus Coeruleus* est la principale source de noradrénaline du système nerveux central. [Source : Adapté de Berridge and Waterhouse, 2003]

Les corps cellulaires de ces neurones sont étroitement regroupés en de petites structures appelées noyaux. Ils ont été cartographiés pour la première fois en 1964 par Annica Dahlström et Kjell Fuxe (Dahlstroem and Fuxe, 1964). Situés au niveau du Pons et de la *medulla oblongata*, les noyaux noradrénergiques ont été classifiés en 7 groupes cellulaires (**A1-A7**). Les groupes **A1**, **A2**, **A4** et **A6** (*Locus Coeruleus*) appartiennent au système ascendant dont les afférences projettent sur le cerveau antérieur et le cervelet (**Figure 41**).

Les neurones du noyaux **A5** et **A7**, situés respectivement en position ventro-caudale du LC¹⁰⁸ et dans le *Subcoeruleus*, appartiennent au système descendant. Ils envoient leurs prolongements sur les neurones sympathiques pré-ganglionnaires de la moelle épinière assurant une modulation de l'activité du système sympathique périphérique par le système nerveux central (Kvetnansky et al., 2009).

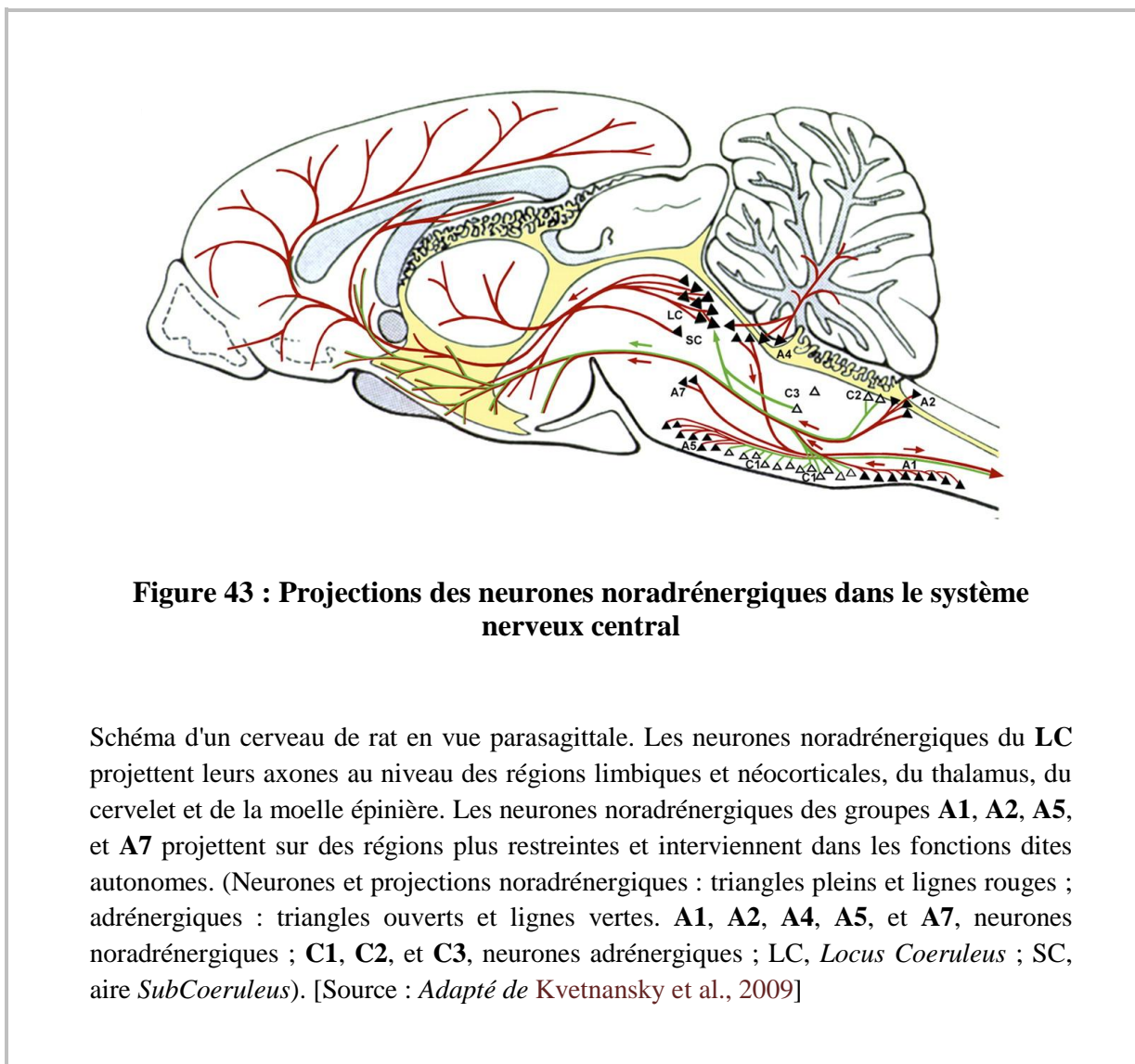
2. Le Locus Coeruleus est le principal noyau noradrénergique

Situé bilatéralement au niveau du Pons, à côté du quatrième ventricule, le LC est la principale source de NA du système nerveux central (**Figures 41**). Bien qu'il contienne relativement peu de neurones (quelques 1 500 chez le rat et 15 000 chez les primates (Mouton et al., 1994), le LC innerve la quasi-totalité des régions cérébrales ainsi que la moelle épinière (**Figure 43**) (Sara and Bouret, 2012).



¹⁰⁸ LC : *Locus Coeruleus*

La plupart des neurones qu'il contient utilise la NA comme neurotransmetteur ; quelques-uns utiliseraient également le GABA, bien que leur rôle reste encore à déterminer. Selon leur morphologie, les neurones du LC peuvent être regroupés en différentes catégories (**Figure 42**) (Cintra et al., 1982 ; Loughlin et al., 1986). Chaque catégorie étend son axone dans des régions cérébrales spécifiques. Les neurones fusiformes projettent dans le cortex et l'hippocampe alors que les neurones multipolaires innervent le cervelet et la moelle épinière ; les petits neurones arrondis, quant à eux, ciblent l'hypothalamus (Loughlin et al., 1986). Un même neurone peut innerver plusieurs régions cérébrales (Foote and Morrison, 1987).



Le niveau d'activité du LC corrèle fortement avec l'état de vigilance. En période d'éveil calme, les neurones du LC déchargent à une fréquence lente et régulière d'environ 1 Hz. Cette fréquence de décharge augmente en réponse à des stimulations brusques comme un flash lumineux ou un bruit intense (Berridge and Waterhouse, 2003 ; Sara, 2009) et précède les réponses comportementales (Aston-Jones et al., 1997 ; Bouret and Sara, 2004 ; Sara and Segal, 1991)

3. Les fibres noradrénergiques innervent l'ensemble du néocortex

Les neurones noradrénergiques du LC projettent leurs axones dans le cortex cérébral, innervant les cortex cingulaires, prélimbiques et infralimbiques (**Figure 43**) (Jones et al., 1977). La quasi-totalité des régions cérébrales sont innervées à l'exception des ganglions de la base (voir Foote and Morrison, 1987 pour revue).

L'innervation noradrénergique dans les différentes couches du cortex a été présentée par immunohistochimie de la DBH réalisée chez le singe (**Figure 44**) (Berger and Alvarez, 1994; Sadikot and Parent, 1990). Une distribution dense et uniforme est observée dans le gyrus denté, la région CA1 de l'hippocampe et le subiculum humain (Gaspar et al., 1989 ; Samson et al., 1990).

Des études anatomiques et fonctionnelles révèlent que le PFC envoie des projections sur les noyaux noradrénergiques en retour, suggérant un rétrocontrôle de la libération corticale de NA (Jodo et al., 1998). L'effet de la NA sur les régions cibles dépend largement des types de récepteurs qui s'y trouvent et de leur distribution.

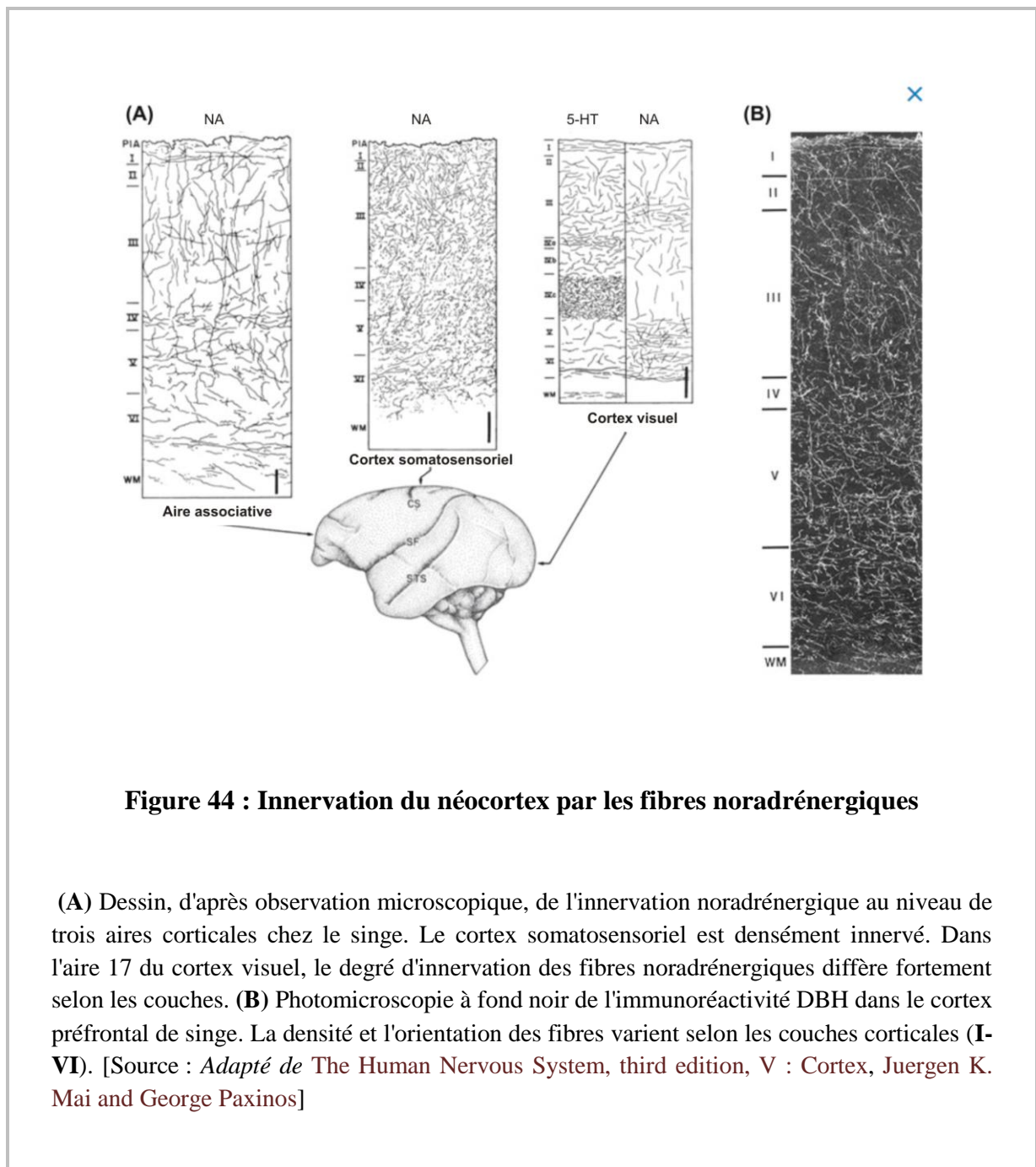


Figure 44 : Innervation du néocortex par les fibres noradrénergiques

(A) Dessin, d'après observation microscopique, de l'innervation noradrénergique au niveau de trois aires corticales chez le singe. Le cortex somatosensoriel est densément innervé. Dans l'aire 17 du cortex visuel, le degré d'innervation des fibres noradrénergiques diffère fortement selon les couches. (B) Photomicroscopie à fond noir de l'immunoréactivité DBH dans le cortex préfrontal de singe. La densité et l'orientation des fibres varient selon les couches corticales (I-VI). [Source : *Adapté de The Human Nervous System, third edition, V : Cortex, Juergen K. Mai and George Paxinos*]

C. Le métabolisme de la NA est compartimenté

Comme toutes les CAT, la NA est une molécule organique composée d'un groupe catéchol associé à un groupement amine. Elle est synthétisée à partir de la L-Tyrosine dans les

cellules endocrines catécholaminergiques et les neurones du système nerveux central et périphérique.

1. Voie de synthèse et stockage de la NA

A la fin des années 1930, Hermann Blaschko étudie les travaux d'Otto Neubauer sur l'ensemble des réactions conduisant à la production des acides aminés. Il propose alors une voie de synthèse pour la noradrénaline et l'adrénaline (Blaschko et al., 1937a) qui sera confirmée une dizaine d'années plus tard (**Figure 45**) (Blaschko et al., 1950; Blaschko, 1954, 1957).

Dans un premier temps, la L-Tyrosine est convertie en L-Dopa¹⁰⁹ par l'enzyme TH¹¹⁰ située dans le cytosol. Cette réaction est le facteur limitant de la biosynthèse des CAT. Une seconde enzyme, l'AACD¹¹¹, catalyse la décarboxylation de la L-Dopa en DA¹¹² qui est alors transportée du cytoplasme vers des vésicules de stockage intracellulaires.

Dans les neurones dopaminergiques du système nerveux central, la DA est directement utilisée en tant que neurotransmetteur. Dans les neurones noradrénergiques et les cellules chromaffines de la médullosurrénale, en revanche, la DA est convertie en NA grâce à la DBH¹¹³, une enzyme spécifiquement active dans les vésicules de stockage (**Figure**) (Kvetnansky et al., 2009).

2. Libération de la NA par exocytose

Dans le système nerveux, la libération de la NA dans l'espace extracellulaire est stimulée par l'influx calcique succédant à un PA (Südhof and Rizo, 2011). La libération

¹⁰⁹ L-Dopa : DihydroxyPhénylAlanine Lévogyre

¹¹⁰ TH : Tyrosine Hydroxylase

¹¹¹ AACD : *Aromatic Aminoacid DeCarboxylase*

¹¹² DA : DopAmine

¹¹³ DBH : Dopamine β -Hydroxylase

vésiculaire (ou exocytose) a lieu le long de l'axone, au niveau de portions dilatées appelées varicosités (**Figure 46**) (Séguéla et al., 1990).

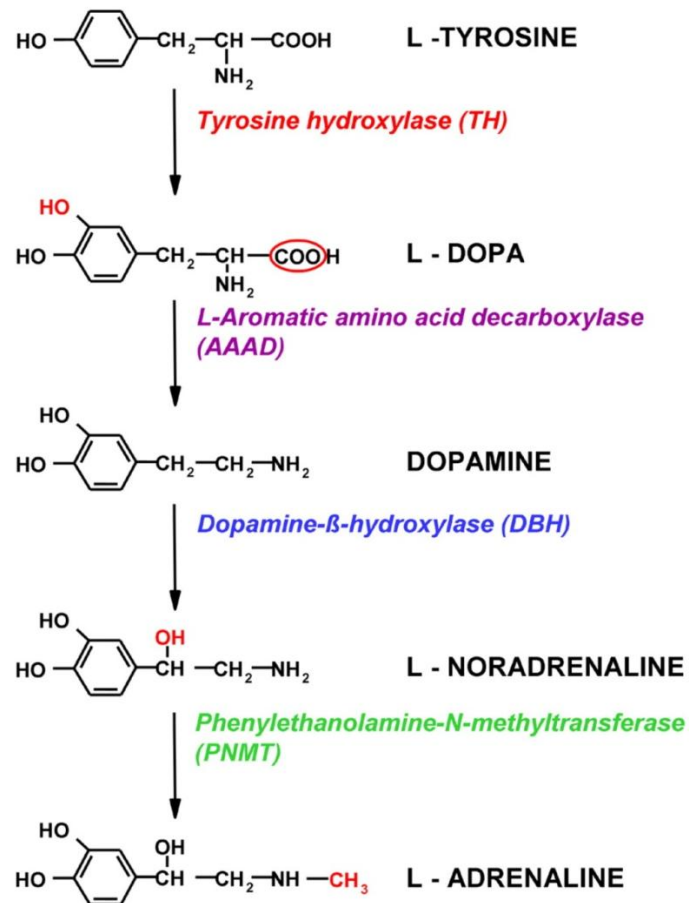


Figure 45 : Voie de synthèse de la noradrénaline

Les enzymes intervenant à chaque étape de la synthèse sont représentées en couleur, le nom des composés ainsi que leur structure moléculaire en noir, les modifications moléculaires dues à la dernière réaction enzymatique en rouge. [Source : *Adapté de Kvetnansky et al., 2009*]

Pour des raisons pratiques, le terme de "synapse" est très souvent employé mais le phénomène de libération peut avoir lieu en l'absence d'élément postsynaptique spécialisé (i.e. Complexe jonctionnel) (Descarries et al., 2008).

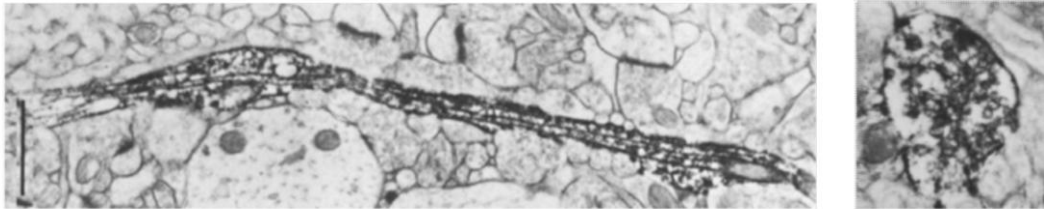


Figure 46 : Varicosité axonale d'un neurone noradrénergique projetant dans le cortex

Observation en microscopie électronique d'un axone en coupe longitudinale (à gauche) et transversale (à droite) après marquage de la noradrénaline. Les varicosités sont les zones dilatées, non spécialisées, contenant de nombreuses vésicules amassées (Echelle : 1 μm). [Source: *Adapté de Séguéla et al., 1990*]

3. Recapture de la NA extracellulaire

Les travaux menés par Julius Axelrod à la fin des années 1950 ont permis de découvrir que les CAT libérées ne demeurent pas longtemps dans l'espace extracellulaire. En effet, si elles ne se lient pas à un récepteur cible, elles sont rapidement recaptées par les varicosités axonales, par les cellules cibles ou encore par la glie environnante. Cette fonction est assurée par plusieurs types transporteurs membranaires.

Les NET¹¹⁴ sont des transporteurs dépendants des ions sodium et chlorure qui sont spécifiquement exprimés dans les neurones noradrénergiques (**Figure 47**) (Torres et al., 2003). Ils présentent une forte affinité pour la NA et la DA et une faible capacité de

¹¹⁴ NET : *NorEpinephrine Transporters*

transport. Ils se situent aussi bien au niveau du soma que de l'axone et des dendrites (Schroeter et al., 2000), mais à distance de la "synapse" où la NA est libérée. Cette dernière doit donc diffuser dans l'espace extracellulaire avant d'être évacuée (Torres et al., 2003). Des études immunohistochimiques menées chez le rat ont révélé la présence des NET à la membrane des cellules épendymaires, en revanche, aucune immunofluorescence n'a été détectée dans les cellules gliales (Schroeter et al., 2000).

Dans le cerveau, la recapture de la NA peut également être effectuée par les EMT¹¹⁵ et les PMAT¹¹⁶. Ces transporteurs de faible affinité possèdent cependant une haute capacité de transport. Récemment mis en évidence dans les cellules gliales ils restent principalement détectés dans les neurones (Vialou et al., 2008). Après la libération de NA dans la fente synaptique, celle-ci va se déverser en dehors de la synapse pouvant diffuser sur des distances relativement importantes (de l'ordre de 20 microns) (Daws, 2009). Les EMT et PMAT interviendraient au niveau postsynaptique et dans les cellules périphériques afin de limiter la diffusion latérale du neurotransmetteur (Duan and Wang, 2010 ; Gasser et al., 2017).

4. Recyclage de la NA par les neurones noradrénergiques

La NA évacuée de l'espace extracellulaire peut être à nouveau transportée du cytosol vers des vésicules de stockage grâce à des transporteurs vésiculaires de monoamines (**Figure 47**) (Wimalasena, 2011). Deux isoformes de VMAT¹¹⁷ ont été clonées jusqu'à présent. VMAT1 est préférentiellement exprimée dans les cellules endocrines alors que VMAT2 est majoritairement détectée dans les neurones (Cliburn et al., 2016) et dans les cellules β pancréatiques.

Ces transporteurs sont dépendants des ions sodium et chlorure et requièrent la mise en place d'un gradient de protons par les pompes H^+ -ATP dépendantes (**voir chapitre 2, partie I.A.2.b**). Le système de stockage vésiculaire n'est pas figé, environ 90% de la NA est séquestrée grâce au VMAT mais les fuites passives conduisent à la libération permanente d'environ 10% des stocks (Eisenhofer et al., 1992).

¹¹⁵ EMT : *Extraneuronal Monoamine Transporters*

¹¹⁶ PMAT : *Plasma membrane MonoAmine Transporters*

¹¹⁷ VMAT : *Vesicular MonoAmine Transporter*

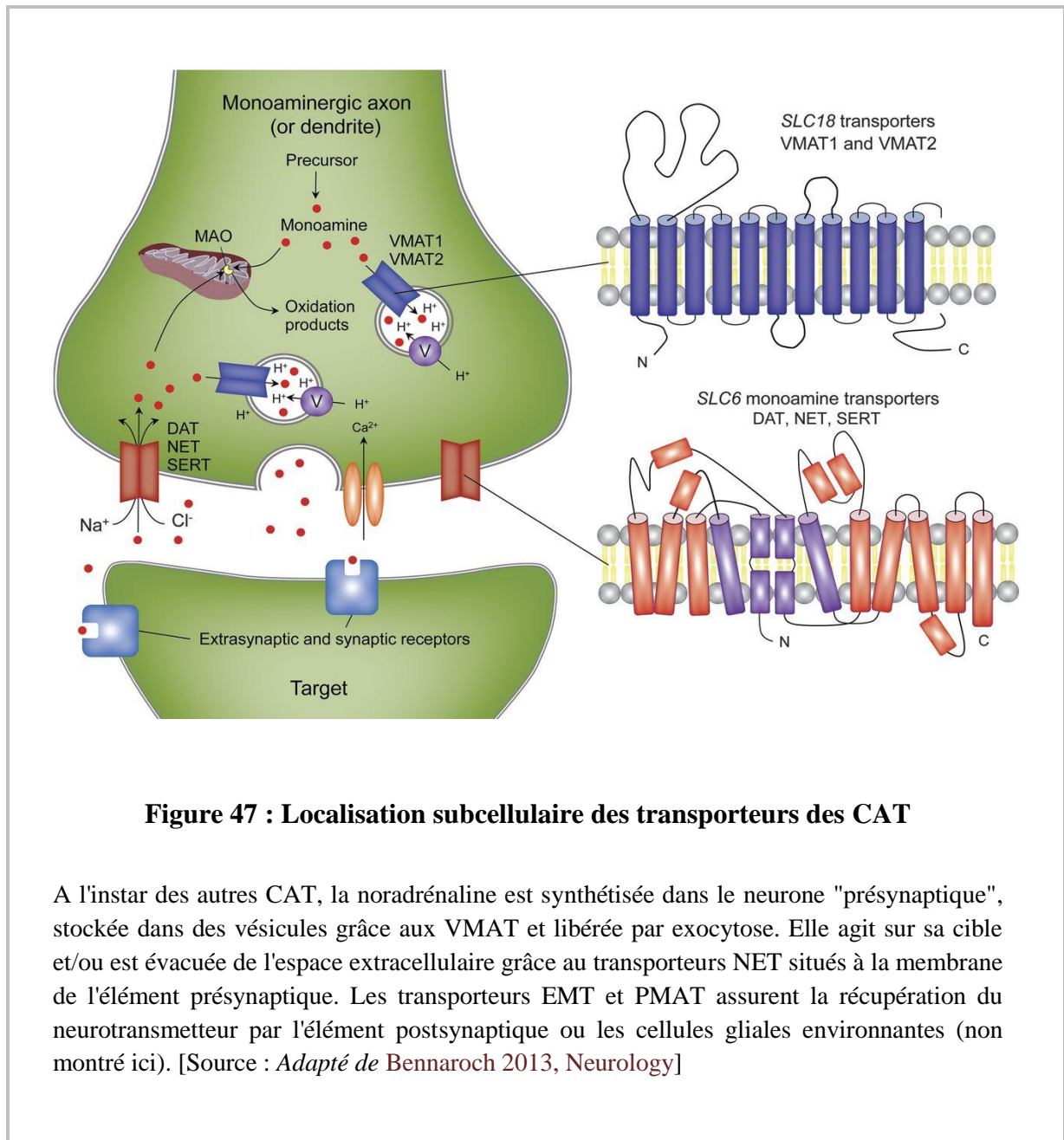


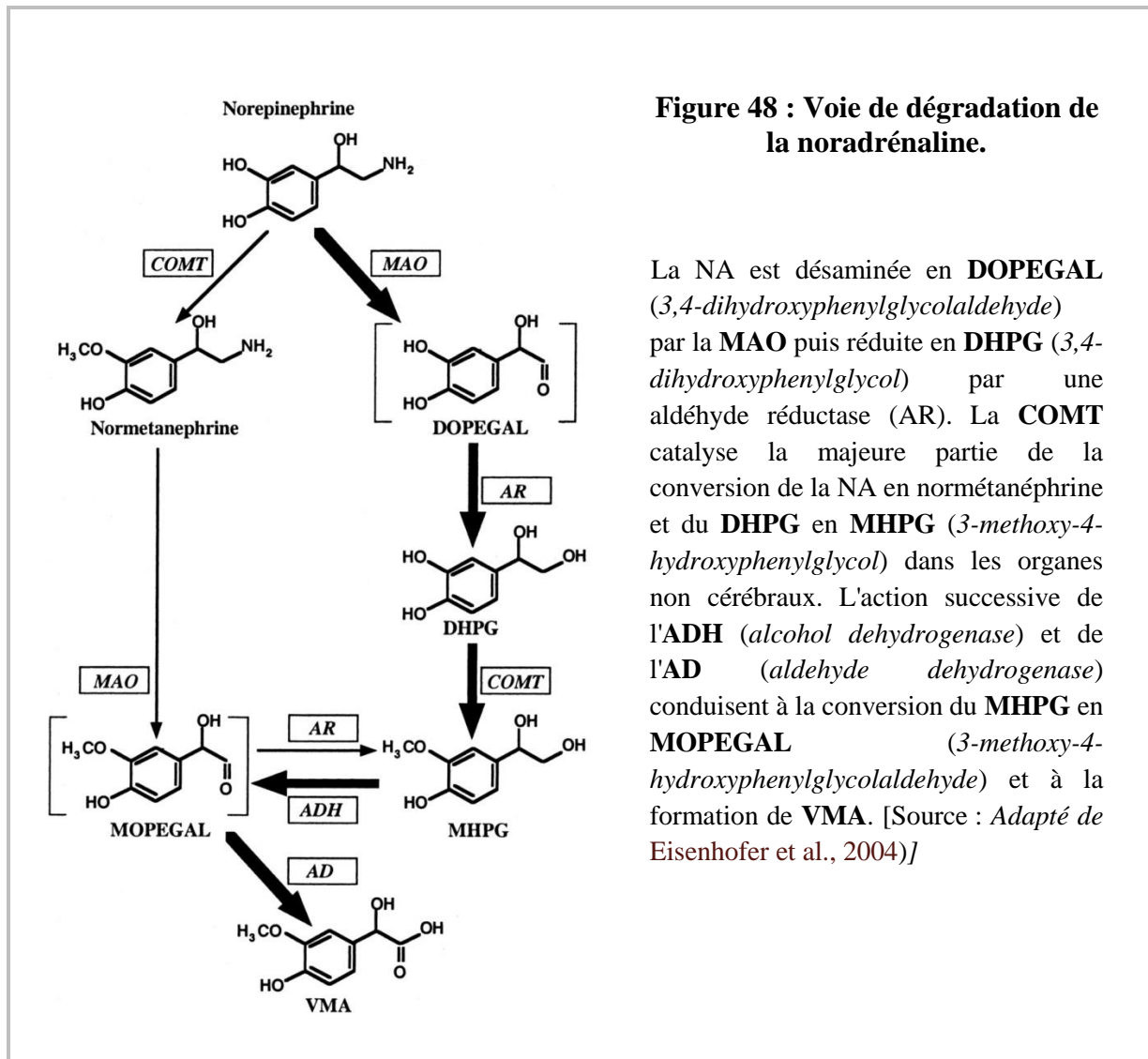
Figure 47 : Localisation subcellulaire des transporteurs des CAT

A l'instar des autres CAT, la noradrénaline est synthétisée dans le neurone "présynaptique", stockée dans des vésicules grâce aux VMAT et libérée par exocytose. Elle agit sur sa cible et/ou est évacuée de l'espace extracellulaire grâce au transporteurs NET situés à la membrane de l'élément présynaptique. Les transporteurs EMT et PMAT assurent la récupération du neurotransmetteur par l'élément postsynaptique ou les cellules gliales environnantes (non montré ici). [Source : *Adapté de Bennaroch 2013, Neurology*]

5. Catabolisme

Une fois dans le cytosol, la NA qui n'a pas été rechargée dans des vésicules d'exocytose est convertie en métabolites inactifs. Deux enzymes peuvent intervenir pour

réaliser ce processus, la MAO¹¹⁸ et la COMT¹¹⁹ (**Figure 48**). Elles sont également impliquées dans la dégradation des autres CAT.



Mise en exergue par Hermann Blaschko à la fin des années 30 (Bhagvat et al., 1939; Blaschko et al., 1937b), la MAO est située au niveau de la membrane externe des mitochondries. Cette enzyme oxyde la NA et serait la voie prédominante pour la dégradation de la NA dans le cerveau. Il existe deux isoformes codées par des gènes distincts. Les neurones noradrénergiques et dopaminergiques expriment principalement

¹¹⁸ MAO : MonoAmine Oxydase

¹¹⁹ COMT : Catéchol-O-Méthyl Transférase

l'isoforme MAO-A alors que la glie et les neurones sérotoninergiques expriment préférentiellement la MAO-B (Shih and Chen, 1999).

La COMT peut aussi intervenir dans le catabolisme de la NA. Cette enzyme découverte par Julius Axelrod (Axelrod 1962) peut méthyler les radicaux hydroxyles des CAT. Les études immunohistochimiques réalisées chez la souris par Männistö et son équipe révèlent que la COMT est largement exprimée dans les différents organes (i.e. cœur, foie, poumons, rate, reins). Dans le cerveau, elle semble être principalement localisée au niveau du cortex et de l'hypothalamus ; majoritairement dans les neurones pyramidaux postsynaptiques et dans les cellules gliales (Myöhänen et al., 2010).

Lors des différentes réactions du catabolisme, les intermédiaires toxiques, pouvant être générés, sont rapidement réduits en alcool (par une réductase cytosolique) ou oxydés en acides (par une déshydrogénase mitochondriale). Le produit final de la dégradation de la NA, le VMA¹²⁰, est excrété dans l'urine (**Figure 48**) (Armstrong et al., 1957 ; Armstrong and McMILLAN, 1959).

II. Effet de la NA sur les neurones pyramidaux corticaux

Le concept de récepteur a été proposé par Dale au début des années 1900. En injectant des extraits d'ergot de seigle chez des lapins et des chats, le pharmacologue observe un effet "d'annulation de l'adrénaline" sur la contraction musculaire. Ces travaux le conduisent à penser qu'il existe des "substances réceptives" aux CAT¹²¹ (Dale, 1906) mais c'est Raymond Ahlquist qui, 40 ans plus tard, suggèrera que les CATs peuvent agir via deux classes de récepteurs (Ahlquist, 1948). Comme en témoigne la riche innervation noradrénergique, les RA sont largement distribués dans le cortex (Nicholas et al., 1996).

¹²⁰ VMA : *VanillylMandelic Acid*

¹²¹ CAT : Catecholamines

A. Les récepteurs noradrénergiques sont largement exprimés dans le néocortex

1. Distribution corticale des récepteurs α adrénergiques

Les récepteurs α_1 et α_2 sont tous deux exprimés dans le cortex cérébral, avec un profil d'expression spécifique pour chacun des sous-types. Les RA- α_1 sont principalement situés au niveau postsynaptique tandis que les RA- α_2 sont à la fois au niveau pré et postsynaptique (Milner et al., 1998).

a. Localisation des récepteurs α_1

Différentes études d'hybridation *in situ* ont permis d'examiner la distribution des ARNm des RA- α_{1a} , α_{1b} et α_{1d} . (Day et al., 1997 ; McCune et al., 1993 ; Pieribone et al., 1994). Les résultats obtenus dans le cortex cérébral sont présentés ci-après.

RA- α_{1a}

L'ARNm RA- α_{1a} est largement exprimé dans le système nerveux central, avec un niveau d'expression modéré dans le cortex cérébral (**Figure 49**). Aucune expression n'est détectée dans la couche **I** à l'exception de quelques cellules isolées. Les couches **II-III** présentent le marquage le plus fort et la couche **IV** le plus faible. Un niveau d'expression similaire et modéré est observé dans les couches **V-VI**.

RA- α_{1b}

Le niveau d'expression de l'ARNm des RA- α_{1b} est relativement uniforme et modéré dans le cortex cérébral (**Figure**). Les couches plus profondes (**V-VI**) présentent un marquage plus fort alors que celui-ci est beaucoup plus léger dans les couches **II-III** et la couche **IV** semble posséder une étroite bande de cellules marquées.

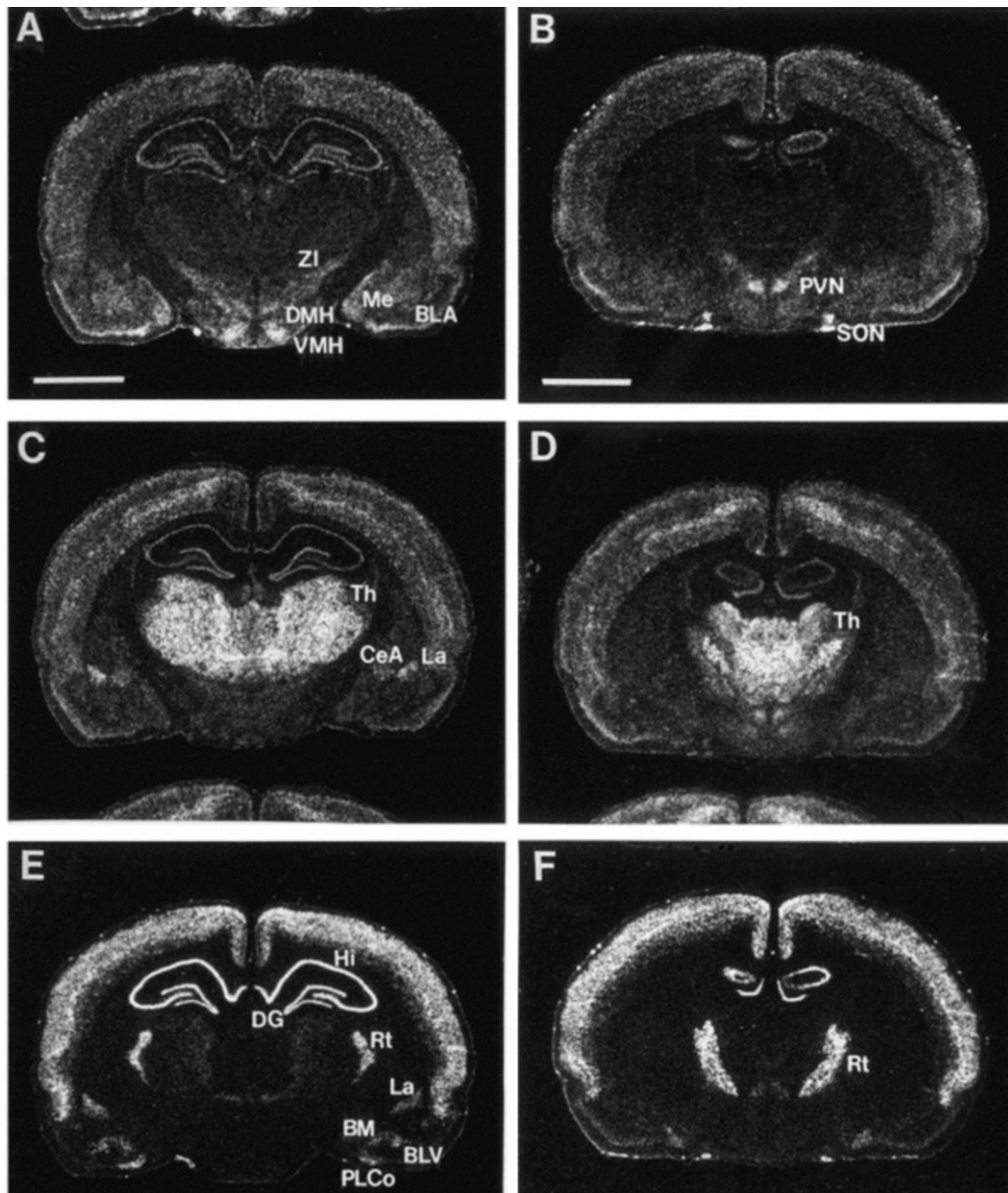


Figure 49 : Distribution cérébrale des récepteurs α_{1a} (Haut), α_{1b} (Milieu) et α_{1d} (Bas)

Photomicrographies sur fond noir de sections coronales de cerveau de rat révélant le profil de distribution des ARNm des RA- α_{1a} (Haut : A, B), α_{1b} (Milieu : C, D) et α_{1d} (Bas : E, F) par hybridation *in situ* (barre d'échelle 3 mm). [Source : Adapté de Day et al., 1997]

RA- α_{1d}

La distribution de l'ARNm du RA- α_{1d} est plus discrète à l'échelle de l'ensemble du cerveau, mais le niveau d'expression est fort dans le cortex (**Figure 49**). L'expression est nulle dans la couche **I**, modérée à forte dans les couches **II-III** et très forte dans les couches **IV-V**. La couche **VI** possède quelques cellules marquées uniquement.

Ces récepteurs sont exprimés en proportion égale dans les cellules pyramidales (VGluT1 positives) et dans les neurones GABAergiques (GAD 65-67 positifs) (Santana et al., 2013). Les trois sous-types présentent des profils d'expression distincts qui peuvent cependant se recouvrir dans certaines régions. Ces données suggèrent un rôle unique pour chacun de ces récepteurs et une complexité significative des réponses cellulaires.

b. Localisation des récepteurs α_2

Les études immunohistochimiques réalisées dans le cortex visuel montrent une détection des RA- α_2 dans toutes les couches corticales, aussi bien au niveau des neurones pyramidaux que des interneurones et des cellules gliales (Milner et al., 1998). Ceci est en accord avec les études d'hybridation *in situ* révélant une expression ubiquitaire des RA- α_2 . Certains auteurs détectent cependant un marquage plus fort de la couche **VI** (McCune et al., 1993 ; Nicholas et al., 1993a).

L'utilisation de lignées transgéniques dans laquelle le gène rapporteur LacZ est sous contrôle du promoteur du récepteur α_{2b} indique que ce dernier est préférentiellement exprimé dans les couches **II-III** et **VI** du cortex (Wang et al., 2002). Ces données ont été confirmées ultérieurement par des travaux d'hybridation *in situ* (Tavares et al., 1996 ; Winzer-Serhan et al., 1997). Les RA α_{2c} sont, quant à eux, largement distribués dans le cortex et sont détectés dans toutes les couches corticales (McCune et al., 1993).

2. Distribution corticale des récepteurs β adrénergiques

Les expériences d'hybridation *in situ* et d'autoradiographies ont montré une large expression des RA- β dans le cortex (**Figure 50**). Le marquage le plus fort est observé pour le sous-type β_1 dans les couches superficielles (Lorton and Davis, 1987 ; Nicholas et al., 1993b ; Rainbow et al., 1984). L'expression extensive de β_1 a été confirmée par immunohistochimie (Paschalis et al., 2009).

Dans le cortex de rat, le signal autoradiographique de β_2 est plus fort dans la couche **IV** que dans les autres couches (Rainbow et al., 1984). En comparaison avec β_1 et β_2 , un très faible niveau de β_3 a été détecté dans le cortex humain et celui du rat par PCR (Rodriguez et al., 1995 ; Summers et al., 1995).

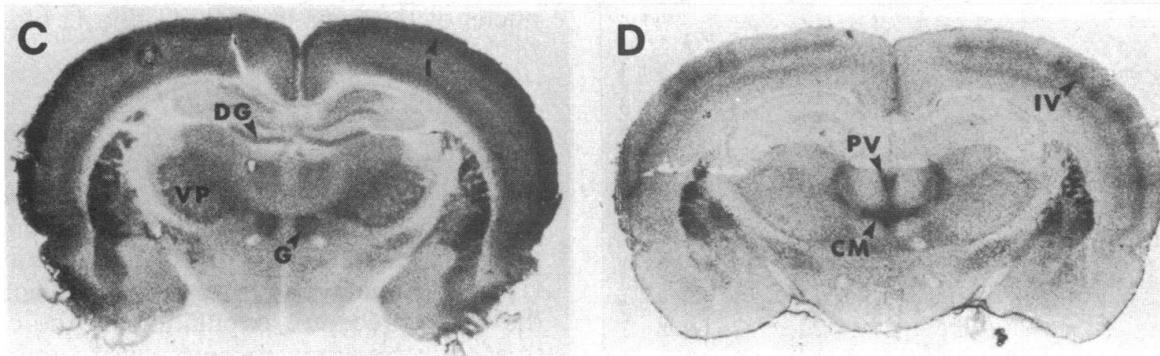


Figure 50 : Distribution cérébrale des récepteurs β_1 (gauche) et β_2 (droite)

Autoradiographie sur tranches coronales de cerveau de rat. [Source : *Adapté de* Rainbow et al., 1984]

B. Les récepteurs noradrénergiques sont couplés à des protéines G assurant la transduction du signal

La NA exerce ses effets en se liant et en activant des récepteurs localisés à la surface des cellules. Tous sont des récepteurs couplés aux protéines G ; ils exercent leur action via un système complexe de second messager (le détail de la structure des GPCR¹²² et les voies de signalisations qu'ils impliquent ne seront que très brièvement abordés dans ce manuscrit, voir Hoffmann et al., 2008 pour revue).

Le premier gène codant pour un récepteur adrénergique a été cloné en 1986 par l'équipe de Strader (Dixon et al., 1986). Aujourd'hui, l'ensemble des gènes codant pour les RA¹²³ ont été clonés. Ils sont au nombre de neuf (α 1a, α 1b, α 1d, α 2a, α 2b, α 2c, β 1, β 2 et β 3) et sont généralement regroupés en 3 classes : α 1, α 2 et β (**Figure 52**). L'affinité des RA pour la NA varie d'un type à l'autre ; on distingue par ordre décroissant : les RA- α 2 ($K_m \approx 50$ nM), α 1Rs ($K_m \approx 300$ nM) and β Rs ($K_m \approx 0.7-0.8$ μ M) (**Figure 51**) (d'après la revue de Ramos and Arnsten, 2007).

L'adrénaline et la NA se liant aux mêmes récepteurs, la terminologie RA est le plus souvent utilisée pour traiter de ces récepteurs et sera employée dans ce manuscrit.

1. Les récepteurs α adrénergiques

a. Récepteurs α 1 adrénergiques et protéine Gq

Les récepteurs α 1 sont considérés comme postsynaptiques et de surcroît excitateurs (**Figure 53**). Dans le cortex somatosensoriel par exemple, leur activation augmente l'excitation générée par l'administration de glutamate ou d'acétylcholine (Mouradian et al., 1991). Cependant, ces récepteurs peuvent aussi moduler la libération présynaptique de

¹²² GPCR : *G Protein Coupled Receptors*

¹²³ RA : Récepteurs Adrénergiques

neurotransmetteurs, comme c'est le cas pour les terminaisons glutamatergiques qui innervent la couche V du cortex préfrontal (Marek and Aghajanian, 1999).

Les RA- α 1 sont également exprimés dans la glie (Hertz et al., 2010), leur activation conduit à une augmentation des courants transitoires calciques dans les astrocytes de l'hippocampe ainsi que dans la glie de Bergmann (Kulik et al., 1999).

Généralement couplés aux protéines Gq, ces récepteurs peuvent activer la PLC¹²⁴ et la voie de signalisation intracellulaire du PI¹²⁵ (Cotecchia, 2010). Cette voie conduit à l'activation de la protéine kinase PKC¹²⁶ et à la libération de calcium intracellulaire dépendante de l'IP3¹²⁷ (Figure 54).

Type de RA	Affinité
α 2	Km ~ 50 nM
α 1	Km ~ 300 nM
β	Km ~ 0.7 - 0.8 μ M

Figure 51 : Affinité des trois types de RA pour la noradrénaline

Le RA- α 2 a la plus forte affinité pour la NA suivi par ordre décroissant par le RA- α 1 et le RA- β . [Source : A partir des données de Ramos and Arnsten, 2007]

¹²⁴ PLC : PhosphoLipase C

¹²⁵ PI : Phosphatidyl Inositol

¹²⁶ PKC : Protein Kinase C

¹²⁷ IP3 : Inositol 1,4,5-triPhosphate

b. Récepteurs α_2 adrénergiques et protéine Gi

La NA se lie aux RA- α_2 avec une haute affinité (**Figure 51**). Des trois sous-types existants, tous sont présents au niveau postsynaptique (Lee et al., 1998) alors que les terminaisons présynaptiques des neurones noradrénergiques ne possèdent que les sous-types α_2 -a et α_2 -c (Milner et al., 1998 ; Venkatesan et al., 1996). Dans le système nerveux central, la technique d'hybridation *in situ* a permis de détecter les ARNm des RA- α_1 et α_2 dans le cortex, le gyrus denté, la glande pinéale et dans une grande variété de noyaux cérébraux (Nicholas et al., 1993a).

La fonction physiologique la plus connue associée aux récepteurs α_2 est le rétrocontrôle négatif qu'ils exercent sur la libération de neurotransmetteurs par les varicosités noradrénergiques (**Figure 53**) (Waterhouse et al., 1998). Des études menées chez l'humain suggèrent que ces récepteurs joueraient sur les processus attentionnels en modulant la connectivité entre les différentes régions cérébrales (Coull et al., 1999).

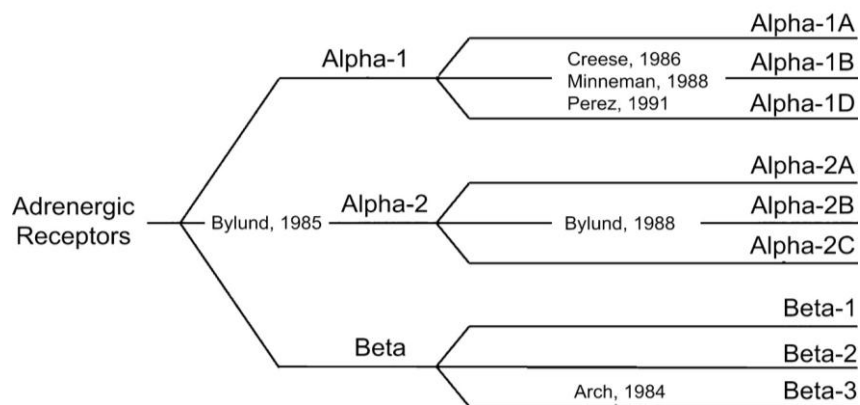


Figure 52 : Classification actuelle des récepteurs noradrénergiques

La classification actuelle distingue trois classes de récepteurs noradrénergiques : α_1 , α_2 , et β , comprenant chacun trois sous-types. [Source : Adapté de Bylund, 2007]

Les RA- α 2 sont généralement couplés aux protéines Gi qui réduisent la concentration intracellulaire en AMPc¹²⁸ en inhibant l'enzyme qui assure sa production : l'AC¹²⁹ (**Figure 54**) (Bylund, 1992 ; Nomura et al., 2014).

2. Les récepteurs β adrénergiques sont couplés aux protéines Gs

Les RA- β sont largement exprimés dans le système nerveux central et périphérique. Sur les trois sous-types qui ont été clonés, les β 1 et β 2 sont les plus abondants dans le cerveau (Nicholas et al., 1996). Des études immunohistochimiques conduites chez le rat révèlent que les RA- β 1 sont fortement exprimés dans le cortex, le striatum et l'hippocampe tandis que les RA- β 2 sont principalement trouvés dans le cervelet et l'hippocampe (Paschalis et al., 2009). Grâce à la technique de RT-PCR, l'équipe d'Evans a détecté l'ARNm du sous-type β 3 dans l'hippocampe, le cortex et le striatum (Summers et al., 1995). Il existe deux variants d'épissage qui diffèrent par leur extrémité C terminale, le variant β 3b est prédominant dans le cerveau (Claustre et al., 2008 ; Summers et al., 1995).

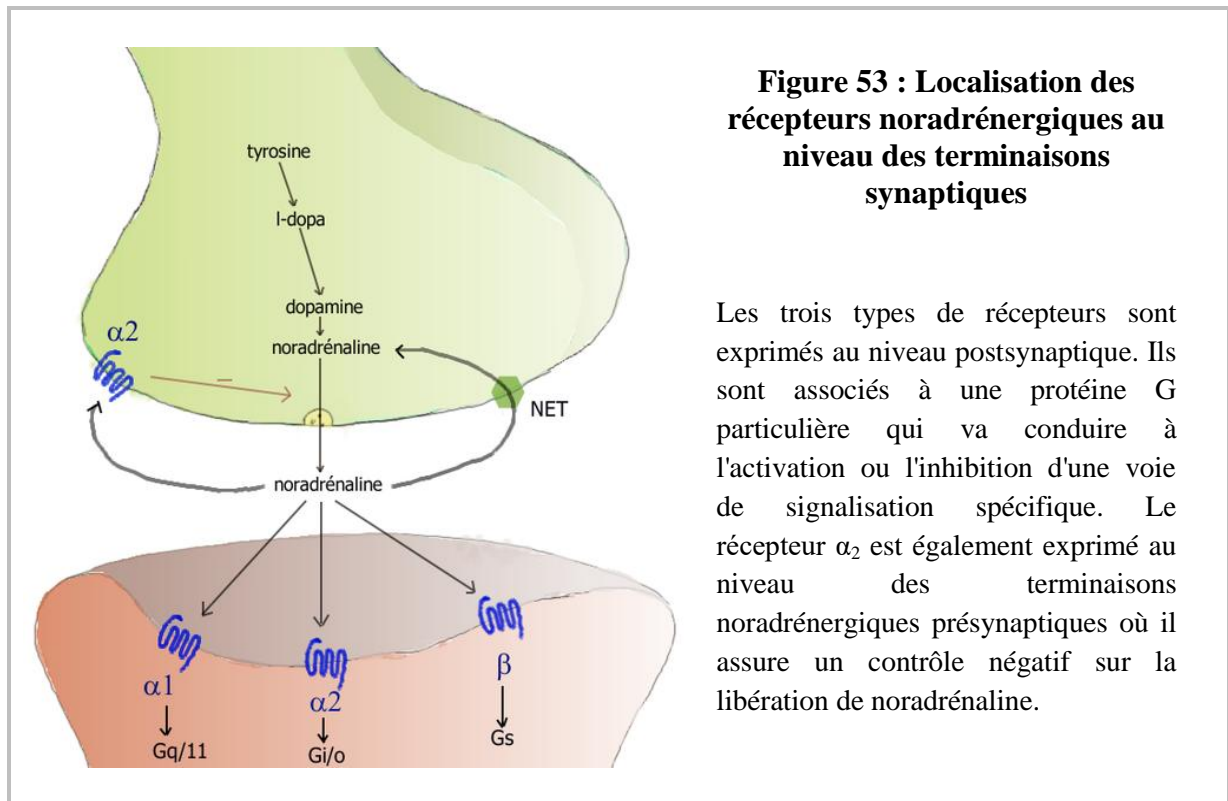
Des études pharmacologiques réalisées chez le rat ont fait valoir le rôle des RA- β dans la consolidation de la mémoire (Sara et al., 1999 ; Tronel et al., 2004). Alors que des expériences de discriminations olfactives ont révélé l'implication conjointe des récepteurs α et β dans ce processus (Doucette et al., 2007).

Ces trois RA- β sont couplés aux protéines Gs qui, une fois activées, vont stimuler la voie AMPc et PKA¹³⁰. Il a été rapporté que les RA- β 2 peuvent également se lier aux protéines Gi, inhibant par-là l'activation de la voie AMPc/PKA par la protéine Gs (**Figure 53 et 54**) (Evans et al., 2010).

¹²⁸ AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

¹²⁹ AC : Adénylate Cyclase

¹³⁰ PKA : Protéine Kinase A



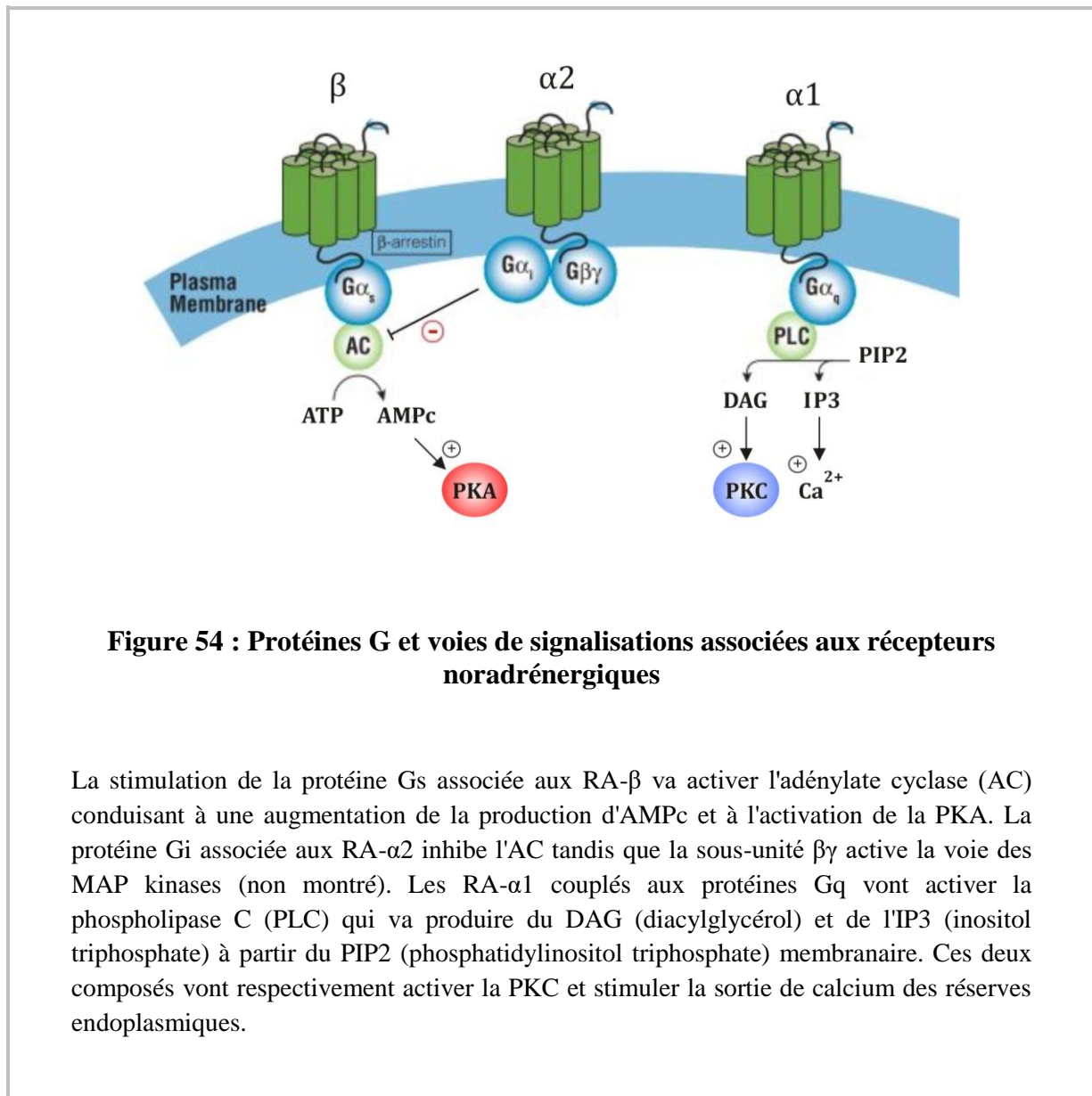
3. L'oligomérisation des récepteurs module la signalisation intracellulaire

Comme les autres récepteurs couplés aux protéines G, les RA peuvent former des multimères avec une grande variété de récepteurs ou de canaux. L'importance de ces complexes dans la régulation des signaux intracellulaires ne sera que brièvement développée ici (voir Rebois and Hébert, 2003 pour revue).

L'oligomérisation est un processus important pour la biologie des récepteurs couplés aux protéines G car elle permet de modifier la voie de signalisation intracellulaire associée à un récepteur (Rebois and Hébert, 2003). Les hétéromères peuvent réguler différentes voies de signalisation et possèdent souvent des profils pharmacologiques précis (Fuxe et al., 2014).

En plus de former des oligomères entre différents membres de la même famille (Cotecchia, 2010), les RA peuvent interagir avec des GPCR appartenant à différentes familles comme les récepteurs olfactifs, opioïdes, sérotoninergiques ou encore cannabinoïdes (Breitwieser, 2004 ; Fribourg et al., 2011). De récentes études menées chez la souris, en système

recombinant, ont montré que les récepteurs β_1 et β_2 pouvaient s'hétérodimériser avec une protéine G_i couplée à un récepteur à l'adénosine de type A (Cotecchia, 2010). Les oligomères ainsi formés présentent une affinité réduite pour les ligands des récepteurs β mais pas pour ceux du récepteur A1. De plus, l'effet inhibiteur de A1 sur la production d'AMPc est abrogée dans les cellules exprimant les dimères A1- β_1 et A1- β_2 .



Si l'oligomérisation des GPCR modifie les propriétés pharmacologiques des récepteurs et les voies de signalisation qui en découlent, elle peut également moduler l'adressage des

récepteurs à la membrane ainsi que leur internalisation (Barak et al., 1997 ; Hague et al., 2004 ; Stanasila et al., 2003).

Enfin, les protéines G sont constituées de trois sous-unités : alpha, bêta et gamma. Plusieurs protéines G peuvent être associées à un récepteur (Milligan, 2007) et pour chaque type de récepteur, différentes sous-unités de la protéine G peuvent intervenir pour générer des effets intracellulaires spécifiques (Bayewitch et al., 1998 ; Cotecchia, 2010). Ainsi, l'activation des RA- α_2 provoque une régulation de la concentration intracellulaire en calcium via l'intermédiaire des sous-unités bêta/gamma de leur protéine G.

D. La NA agit sur les propriétés électrophysiologiques des neurones pyramidaux du néocortex

De par son action sur les différents types de récepteurs, la NA libérée par fibres du LC va moduler les propriétés cellulaires des neurones cibles (potentiel de membrane, excitabilité cellulaire, cascades intracellulaires) et l'efficacité de la transmission synaptique (Salgado et al., 2016 ; Sessler et al., 1995 ; Waterhouse et al., 1990).

1. Effets à long terme sur la plasticité synaptique

L'effet de la NA sur la modulation de la plasticité synaptique a été intensivement étudiée ses dernières années. Harley et son équipe (Neuman and Harley, 1983) ont montré le rôle permissif de la NA dans la LTP. Libérée dans le cortex en réponse à un stimulus ou par l'excitation (Berridge and Waterhouse, 2003), la NA influence de manière critique les processus d'apprentissage et de mémorisation (Constantinople and Bruno, 2011 ; Ramos et al., 2008 ; Wang et al., 2007) . La plupart des études ont été conduites en tranches, au niveau du cortex préfrontal (PFC¹³¹) ou visuel (Bröcher et al., 1992 ; Kato et al., 1991 ; Kirkwood et al., 1999).

¹³¹ PFC : *Prefrontal Cortex*

Plusieurs mécanismes seraient impliqués, comme par exemple la modulation directe des courants NMDA ou encore l'activation de kinases conduisant à l'insertion de récepteurs AMPA au niveau de la membrane postsynaptique (Perugini et al., 2012 ; Seol et al., 2007 ; Zhou et al., 2013). En plus de moduler l'excitabilité des neurones corticaux (Carr et al., 2007 ; O'Donnell et al., 2012), la NA conduirait à une baisse du seuil d'induction de la plasticité synaptique au niveau des synapses glutamatergiques (Huang et al., 2012 ; Salgado et al., 2012 ; Seol et al., 2007).

Des études comportementales menées chez le rongeur, associées à l'utilisation de composés pharmacologiques comme le propranolol (agoniste des RA- β) ont conduit à penser que dans l'hippocampe, le rôle permissif de la NA dans l'induction de la LTP était sous-tendu par les RA- β (Harley, 1987; Kitchigina et al., 1997 ; Uzakov et al., 2005). Des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* ont confirmé l'implication de la cascade intracellulaire de l'AMPC (via l'activation des RA- β) dans la facilitation de la LTP et la formation de la mémoire à long terme (Brightwell et al., 2007 ; Gelinass et al., 2008).

Au niveau du néocortex, les récentes données de la littérature dépeignent un équilibre délicat entre l'activation des RA- α 1 et des RA- β dans la détermination de l'effet modulateur sur les circuits corticaux (Salgado et al., 2012). Dans les synapses excitatrices du cortex visuel par exemple, l'activation des RA- α 1 diminuerait le poids synaptique alors que l'activation des RA- β l'augmenterait (Huang et al., 2012 ; Kirkwood et al., 1999 ; Laing and Bashir, 2014 ; Nowicky et al., 1992 ; Seol et al., 2007). Plusieurs études ont corroboré l'hypothèse selon laquelle les agonistes des RA- α 1 favorisaient sélectivement la LTD et supprimaient la LTP (Salgado et al., 2012 ; Treviño et al., 2012), tandis que les agonistes des RA- β favoriseraient la LTP et supprimeraient la LTD (Huang et al., 2012). De façon générale, l'activation des RA dépend de la concentration en NA et de l'affinité des différents récepteurs présents à la synapse (voir (Ramos and Arnsten, 2007) pour revue).

Enfin, les effets de la NA sur le long terme peuvent également s'exercer grâce à la régulation de l'expression de certains gènes (Havekes et al., 2012 ; Hu et al., 2007 ; Zhou et al., 2013). Selon une récente étude, le renforcement de la LTP par la NA serait favorisé par une translation d'ARNm spécifique dans la région de CA1 (Maity et al., 2015).

L'ensemble de ces résultats révèle que la stimulation comportementale favorise la plasticité synaptique au niveau des neurones excités (Kety, 1972).

2. Effets synaptiques de la NA

a. Régulation des courants glutamatergiques

En période d'éveil, une libération modérée de NA renforcerait l'activité neuronale du PFC et améliorerait la mémoire de travail chez les rats et les singes via l'activation des récepteurs α_2 de haute affinité (Birnbaum et al., 2000 ; Kovács and Hernádi, 2003 ; Li et al., 1999 ; Ramos and Arnsten, 2007 ; Wang et al., 2010). L'activation des RA- α_2 (mais aussi des RA- α_1 postsynaptiques) conduirait à un blocage des courants induits par les récepteurs NMDA (Law-Tho et al., 1993 ; Liu et al., 2006).

A l'inverse, de nombreux enregistrements effectués *in vitro*, dans le cortex visuel, préfrontal ou périrhinal révèlent que l'application de NA potentialise la transmission synaptique excitatrice sous-tendue par les récepteurs NMDA via un mécanisme impliquant les RA- β (**Figure 55**) et l'AMPC (Bröcher et al., 1992 ; Laing and Bashir, 2014).

En période de stress, une forte quantité de NA est libérée par les afférences noradrénergiques. Les rats et les singes exposés à un stress incontrôlable présentent des déficits de mémoire de travail. Ces déficits sont associés à une stimulation excessive des RA- α_1 (Winklewski et al., 2017) et de récentes études rapportent que l'activation postsynaptique des RA- α_1 couplés à la voie PKC altère l'activité des neurones pyramidaux du PFC et la mémoire de travail chez les singes (Arnsten et al., 1999). Plusieurs publications rapportent également que la transmission glutamatergique sous-tendue par les récepteurs AMPA est diminuée de 30% à 80% en présence de NA (10 et 100 μM) aussi bien dans le cortex auditif (Dinh et al., 2009), visuel (Kobayashi et al., 2000) et préfrontal (Law-Tho et al., 1993 ; Ji et al., 2008 ; Roy Chowdhury et al., 2014), et que les RA- α_1 sont principalement impliqués.

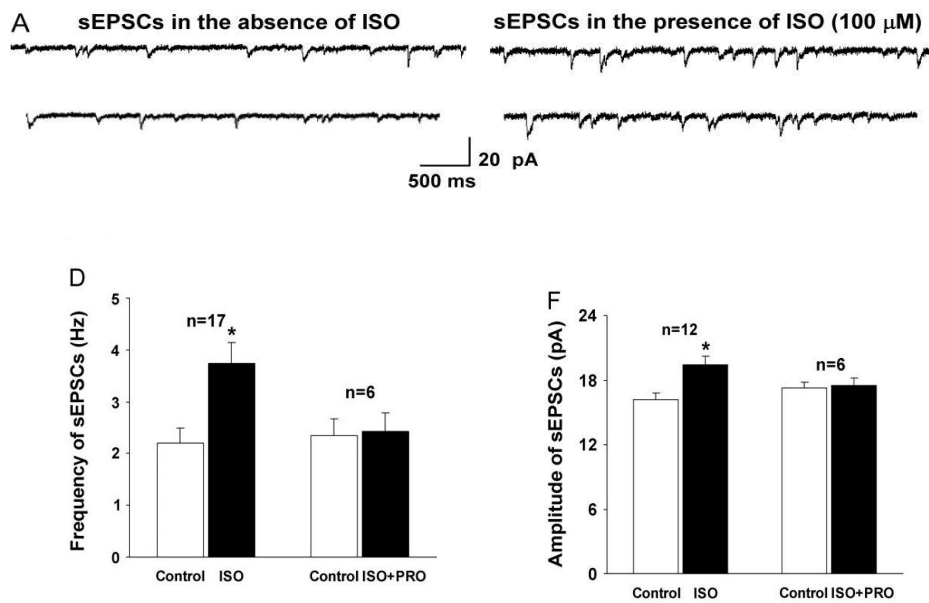


Figure 55 : La stimulation des RA- β augmente la fréquence et l'amplitude des sEPSC

(A) Enregistrements en configuration cellule entière des sEPSC d'une cellule pyramidale du cortex préfrontal, en l'absence (gauche) et en présence (droite) d'un agoniste des RA- β (ISO). (D) Histogramme révélant l'augmentation significative de la fréquence des sEPSC induite par l'ISO. La facilitation sous-tendue par l'ISO (100 μ M) est bloquée par le PRO, antagoniste des RA- β . (F) Histogramme révélant l'augmentation de l'amplitude des sEPSC sous ISO, bloquée par co-application de PRO. Potentiel de maintien -70 mV. * $P < 0.05$ versus control. sEPSC : Potentiel Post Synaptique Excitateur spontané, ISO : Isoprotérénol, PRO : Propanolol. [Source : Adapté de Xiao-Hua Ji et al., 2007]

Les effets de la NA sur les courants glutamatergiques sont variés et dépendent de la qualité des récepteurs présents sur les neurones cibles. Ainsi, selon sa concentration, la NA stimulerait (via les RA- α 1 et β) ou inhiberait (via les RA- α 2) la réponse excitatrice au glutamate.

b. Régulation de la signalisation GABAergique

Historiquement, les effets de la NA sur les potentiels postsynaptiques inhibiteurs ont été étudiés *ex vivo* (*i.e.* sur tranches) dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Madison and Nicoll, 1988).

Les enregistrements intracellulaires montrent que la NA provoque une réduction marquée et réversible des potentiels postsynaptiques inhibiteurs (IPSP) enregistrés dans les neurones pyramidaux de CA1. Ceci suggère un potentiel postsynaptique exciteur intracellulaire (EPSP) plus grand, qui pourrait provoquer la décharge de plus d'un PA. Cet effet désinhibiteur de la NA est dû à un récepteur α et s'exerce au niveau présynaptique des cellules pyramidales. En plus de réduire les IPSP évoqués, la NA cause une augmentation de la fréquence des IPSP spontanés, suggérant que son action ne passe pas par une inhibition des décharges d'interneurones (Madison and Nicoll, 1988). Les travaux du groupe de Kawaguchi J. confirment ces observations. L'application de NA ou d'agoniste alpha provoque une augmentation de la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSC) dans les cellules pyramidales du cortex frontal de rats (Kawaguchi and Shindou, 1998).

Des résultats similaires obtenus *in vitro* ont été mis en évidence dans le cortex somatosensoriel (Sessler et al., 1995) et dans le cervelet (Cheun and Yeh, 1996). Dans ce dernier, une inhibition des cellules de Purkinje a été démontrée suite à une augmentation de GABA dépendante de l'AMPc (Sessler et al., 1989) qui dépendrait des RA- β .

3. Modulation des propriétés intrinsèques des cellules

Les enregistrements électrophysiologiques *in vitro* ont permis une avancée décisive dans l'élucidation des mécanismes cellulaires sous-tendant l'action de la NA sur les fonctions cérébrales. Les études intracellulaires ont permis d'identifier les courants modulés par la NA dans les cellules, régulant ainsi les propriétés intrinsèques des neurones.

Dans le cortex cérébral, l'application extracellulaire de NA augmente la probabilité d'émission des PA (Waterhouse et al., 2000). Dans certains cas la NA favorise même le

passage de neurones silencieux à un mode répondant ((Berridge and Waterhouse, 2003) pour revue). Dans certaines cellules encore, la NA module la rythmicité des décharges et favorise la synchronie des PA (Carr et al., 2007).

a. Modulation des canaux calciques

Les canaux calciques interviennent dans un grand nombre de fonctions cellulaires et sont une cible importante de la modulation noradrénergique. Parmi les effets connus de la NA, l'activation des R- $\alpha 2$ inhibe la libération de glutamate via l'inhibition des canaux calciques de type N (CaV2.2) et P/Q (CaV2.1) (Chiu et al., 2011 ; Timmons et al., 2004). L'activation des canaux calciques de type L par les RA- β joue aussi un rôle important dans la régulation synaptique du glutamate et dans la plasticité à long terme (Kato, 1993).

b. Modulation des canaux potassiques

Les canaux potassiques sont bien connus pour être la cible de la modulation noradrénergique. La liste exhaustive de ces canaux et les travaux ayant conduit à leur découverte ne seront pas développés ici. Citons à titre d'exemple les canaux TREK-2 (canaux cationiques avec une grande perméabilité au potassium) qui sont activés par les RA- $\alpha 2$ et conduisent à une réduction de la libération de glutamate dans le cortex entorhinal (Xiao et al., 2009). Le courant cationique I_h , activé par hyperpolarisation, est également renforcé par la NA dans le cerveau antérieur (McCormick et al., 1991).

Dans d'autres études, la NA, au même titre que de nombreux neurotransmetteurs, provoque une réduction des courants K^+ . Initialement présentés dans l'hippocampe, ces résultats sont aujourd'hui confirmés dans toutes les aires corticales. Parmi ces courants se trouvent les courants de *slow After Hyper-Polarisation* ou sAHP¹³² (Foehring et al., 1989 ; Madison and Nicoll, 1982 ; McCormick et al., 1991).

¹³² sAHP : *slow After Hyper-Polarisation*

Inhibition des courants d'AHP

L'application extracellulaire de NA au niveau des cellules pyramidales de l'hippocampe (Madison and Nicoll, 1986a, 1986b, 1988) et du cortex (Foehring et al., 1989) a pour effet de dépolariser ces cellules et d'augmenter leur excitabilité en réduisant fortement le phénomène d'adaptation (**Figure 56 (A)**). Les neurones passent alors d'un mode de décharge phasique à un mode de décharge tonique. Le phénomène est illustré lors de l'injection continue d'un courant dépolarisant supraliminaire sur une cellule pyramidale : le temps entre deux potentiels d'actions successifs va rapidement augmenter, diminuant la fréquence de décharge du neurone (**Figure 56 (A) gauche**) (Madison and Nicoll, 1986a; McCormick and Pape, 1990).

L'apparition du phénomène d'adaptation résulte de la présence de canaux potassiques dépendants du calcium possédant des cinétiques lentes (les courants sous-tendus par ces canaux peuvent durer quelques secondes) et dont les courants sont sensibles à différents modulateurs (tels que la sérotonine (Segal, 1990), l'acétylcholine, l'histamine (Martín et al., 2001) ou la noradrénaline). Ces canaux sont responsables d'une hyperpolarisation longue nommée sAHP.

La sAHP est généralement observée à la suite d'un train de potentiel d'action (**Figure 56 (B)**), et son amplitude augmente avec le nombre de PA émis par la cellule et avec la fréquence de la stimulation qui lui est imposée (Abel et al., 2004).

Son amplitude diminue très fortement en présence de neuromodulateurs (Nicoll, 1988; Satake et al., 2008). Le courant I_{sAHP} est principalement dû à une sortie de potassium de la cellule (Storm, 1990). La dépendance à l'augmentation de calcium intracellulaire est également démontrée par le blocage de la sAHP lors de l'application extracellulaire d'un bloquant des canaux calciques (Cd^{2+} ou Co^{2+}) (Madison and Nicoll, 1984). De façon plus spécifique, le courant de sAHP manifeste une relation coopérative et dose dépendante avec le calcium cytoplasmique global (Abel et al., 2004). L'identité exacte de ces canaux reste à ce jour inconnue, mais l'implication de plusieurs types de canaux potassiques est fortement envisageable (Tzingounis et al., 2007).

En inhibant l'AHP dépendante du calcium, la NA provoque une réduction de l'adaptation de la décharge des potentiels d'actions (**Figure 56 (C et A)**) de sorte que la réponse excitatrice du neurone à un stimulus dépolarisant est renforcée (**Madison and Nicoll, 1986a**).

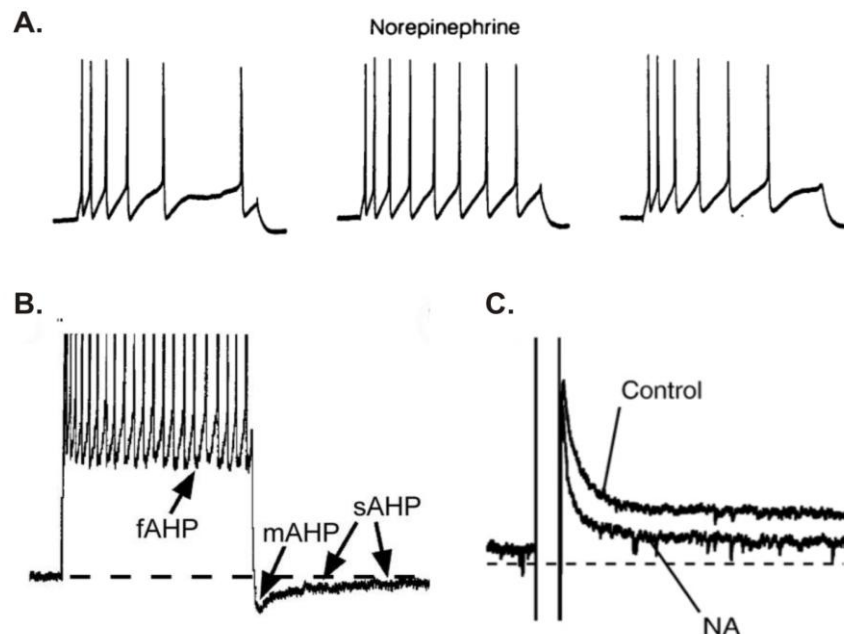


Figure 56 : La NA stimule l'excitabilité des cellules pyramidales en inhibant la sAHP

(A) L'injection intracellulaire d'un courant dépolarisant dans un neurone néocortical humain résulte de la genèse d'un train de PA qui présente une adaptation de la fréquence de décharge (gauche). L'application extracellulaire de NA provoque une réduction réversible de cette adaptation (milieu et droite). (B) Trois types d'AHP sont dégagés par enregistrement en courant imposé d'une cellule pyramidale du cortex somatosensoriel. L'AHP rapide (fAHP) succède à chaque PA, les AHP moyennes et lentes ($\tau > 1$ s) suivent un train de PA (tronqués dans la figure). (C) Enregistrement en potentiel imposé d'une cellule pyramidale du mPFC. La NA inhibe le courant IsAHP induit par un créneau dépolarisant de - 60 mV à + 50 mV pendant 100 ms. [Source : Adapté de (McCormick and Williamson, 1989) (A) (Andrade et al., 2012) (B) (Satake et al., 2008) (C)]

Le courant I_{sAHP}^{133} sous-tendu par ces canaux est un courant sortant d'une amplitude généralement comprise entre 25 et 50 pA et à la cinétique lente (pouvant durer quelques secondes). Ce courant est indépendant du potentiel et n'est pas sensible aux bloquants des canaux responsables des autres AHP (rapide et moyenne) comme le TEA ou l'apamine.

Plusieurs études ont ciblé l'importance de la voie de signalisation de la PKA dans l'inhibition de la sAHP par la NA. L'isoprotérénol, un agoniste des RA- β , a pour effet d'augmenter le nombre de potentiels d'actions émis par les cellules lors de l'injection d'un courant dépolarisant supraliminaire. Cet agoniste des RA- β diminue également l'amplitude des courants I_{sAHP} (**Figure 57**) (Madison and Nicoll, 1982). Réciproquement, les effets de la NA sur l'AHP sont bloqués par un antagoniste des RA- β , le propranolol. Les mêmes expériences menées avec un analogue de l'AMPc (le 8 bromo cyclic AMP) conduisent à des effets similaires à ceux observés en présence de NA (Madison and Nicoll, 1982). De plus, l'ajout d'un inhibiteur de la PKA (PJI) ou d'un inhibiteur compétitif de l'AMPc (Rp-AMPc) bloque les effets de la NA sur la sAHP (Pedarzani and Storm, 1993) confirmant l'implication de la voie de signalisation de la PKA dans la régulation de la sAHP par la NA.

Les mécanismes moléculaires de cette régulation sont mal connus, il est possible qu'ils passent par une phosphorylation directe des canaux responsables de la sAHP par la PKA ou par la phosphorylation de protéines régulatrices intermédiaires.

L'activation de certains récepteurs (comme les récepteurs muscariniques M1 de l'acétylcholine ou les récepteurs métabotropes au kaïnate) a pour effet de diminuer de façon importante l'amplitude d' I_{sAHP} (Melyan et al., 2002). Ce phénomène fait intervenir l'activation de la protéine kinase C par le DAG libéré lors du clivage du PIP_2 membranaire par la PLC. Il a été démontré que l'application intracellulaire de myo-inositol (précurseur du PIP_2) ou la surexpression de PIP_5K (enzyme assurant la synthèse du PIP_2 membranaire) préservait l'amplitude de la sAHP d'une dérive progressive au cours du temps (Villalobos et al., 2011).

¹³³ I_{sAHP} : courant de *slow After Hyper-Polarisation*

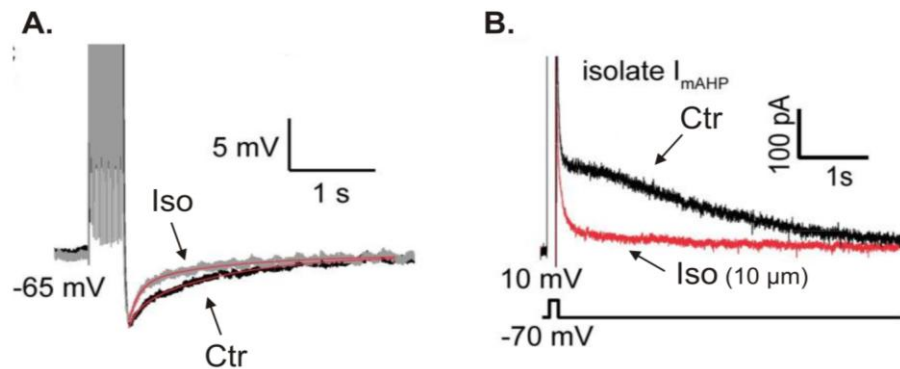


Figure 57 : Implication des RA-β dans la modulation de la sAHP par la NA

(A) Enregistrement en courant imposé d'une cellule pyramidale du cortex somatosensoriel de rongeur. La sAHP révélée par une décharge soutenue d'une seconde est réduite en présence d'isoprotérénol, agoniste des RA-β. (B) Courant de queue révélée en potentiel imposé, à la suite d'un créneau dépolarisant de -70 mV à 0 mV (trace noire). L'isoprotérénol bloque le courant I_{sAHP} . [Source : Adapté de (Abel et al., 2004)]

L'activation des RA- α 1 passant par la voie de signalisation PLC¹³⁴, ces résultats laissent supposer que les RA- α 1 pourraient favoriser la dérive de la sAHP via une dégradation des stocks de PIP₂ membranaires. Cependant, l'application de phényléphrine (agoniste spécifique des RA- α 1) n'a aucun effet sur le rapport d'adaptation (nombre de PA évoqués par l'injection d'un courant supraliminaire) ou les courants I_{sAHP} . De la même façon, un agoniste de ces voies de signalisation, le phentolamine, ne bloque pas l'effet significatif de la NA sur la réduction de ces courants (Madison and Nicoll, 1982), semblant ainsi écarter l'hypothèse d'une implication de la voie de signalisation PKC dans la régulation de la sAHP par la NA.

Les enregistrements électrophysiologiques menés par Storm et Pedarzani sur les cellules pyramidales de l'hippocampe suggèrent une interaction possible entre les deux types de récepteurs. Leurs travaux ont révélé qu'un agoniste des RA- α , le 6-fluoro-Noradrénaline, potentialisait l'effet de l'isoprotérénol (agoniste β) sur la réduction d'amplitude de la sAHP

¹³⁴ PLC : PhosphoLipase C

(Pedarzani and Storm, 1996) et relance donc la possibilité d'une interaction entre les voies de signalisation sous-tendues par les RA- β et $\alpha 1$.

Inhibition des canaux HCN activés par les nucléotides cycliques

Un nouveau mécanisme associé à une diminution de conductance potassique a récemment été mis à jour. Les données obtenues par patch-clamp *in vivo* chez le primate montrent que l'activation des récepteurs $\alpha 2$ dans le PFC résulte d'une diminution de l'AMPC intracellulaire. Cette diminution en AMPc génère à son tour une inhibition des canaux HCN¹³⁵ (activés par les nucléotides cycliques) (Wang et al., 2011).

La fermeture de ces canaux produit une hyperpolarisation du potentiel de membrane et une augmentation significative des PA évoqués dus à une augmentation de la résistance d'entrée de la cellule. L'inhibition des canaux HCN génère également une augmentation significative de l'intégration temporelle des entrées distales excitatrices (Carr et al., 2007) et pourrait être un mécanisme cellulaire important à travers lequel la NA favoriserait les activités associées à certaines tâches comportementales tout en inhibant les décharges associées au "bruit de fond" (Carr et al., 2007).

¹³⁵ HCN : *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated*

Problématique

Le système ascendant noradrénergique innerve abondamment le cortex cérébral des mammifères (Jones et al., 1977). Ce système présente deux profils d'activité distincts, un mode tonique correspondant à une activité de décharge et un mode phasique associé à une plus grande libération de neurotransmetteur. L'activité tonique dépend de l'état d'éveil et régule l'attention (Pribram and McGuinness, 1975) sur de longues périodes. La composante phasique au contraire est évoquée par des activités cognitives définies et dure quelques secondes (Briand et al., 2007).

Le système noradrénergique affecte l'excitabilité des neurones dans les circuits corticaux locaux, qui sont principalement composés de neurones pyramidaux et non-pyramidaux. La NA exerce une action dépolarisante sur une sous-population spécifique de neurones GABAergiques et leur fait décharger des trains de PA (Kawaguchi and Shindou, 1998). Un effet remarquable est également exercé sur les propriétés intrinsèques des membranes des cellules pyramidales. Il s'agit de l'inhibition de l'hyperpolarisation post-PA lente (ou sAHP) (Schwindt et al., 1988a).

La sAHP est due à l'activation des courants potassiques à la suite d'un influx calcique généré lors d'un train de PA. Elle dure quelques secondes (consulter Vogalis et al., 2003 pour revue), accentue l'adaptation de la fréquence de décharge et est un déterminant majeur pour l'excitabilité cellulaire (Madison and Nicoll, 1982).

L'AHP moyenne (ou mAHP) décline plus rapidement que la sAHP (en quelques centaines de millisecondes) (Stocker et al., 1999) et peut également être générée à la suite d'un train de PA par des courants potassiques dépendants du calcium. Elle affecte, elle aussi, l'intervalle entre deux PA (Faber and Sah, 2002). En plus d'une cinétique distincte, ces deux AHP peuvent être séparées pharmacologiquement. Car contrairement à la sAHP, la mAHP est sensible au blocage par l'apamine, une toxine extraite du venin d'abeille.

Contrairement aux autres sAHP, les conductances qui sous-tendent la sAHP ne sont pas encore connues. Il n'existe donc pas de pharmacologie claire. Une forte inhibition de la sAHP a été mise en évidence par un ensemble d'agonistes et de neuromodulateurs incluant la NA (Madison and Nicoll, 1982). Cette inhibition résulte en l'augmentation de la fréquence

de décharge de la cellule en réduisant l'adaptation de fréquence (Madison and Nicoll, 1982; Pedarzani and Storm, 1993).

Plusieurs études ont ciblé l'importance des RA- β et de la voie de signalisation de la PKA dans l'inhibition de la sAHP par la NA (Madison and Nicoll, 1982; Pedarzani and Storm, 1993) là où l'application d'agoniste spécifique des RA- α 1 n'a eu aucun effet (Madison and Nicoll, 1982).

Or, il a été démontré que l'activation de certains récepteurs couplés aux protéines Gq pouvait conduire à la diminution du courant IsAHP (Melyan et al., 2002) et que le PIP₂ membranaire préservait l'amplitude de la sAHP d'une dérive progressive au cours du temps (Villalobos et al., 2011). L'activation des RA- α 1 passant par la voie de signalisation PLC, ces résultats conduisent à penser qu'ils pourraient jouer un rôle dans la modulation de la sAHP. De plus, une étude récente a montré que les agonistes des RA- α 1 provoquaient une augmentation de la fréquence de décharge dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Kobayashi et al., 2008). Enfin, des enregistrements électrophysiologiques réalisés par Storm et Pedarzani ont révélé qu'un agoniste des RA- α , le 6-fluoro-Noradrénaline, potentialisait l'effet de l'isoprotérénol (agoniste β) sur la réduction d'amplitude de la sAHP (Pedarzani and Storm, 1996).

Aussi peut-on se demander s'il existe une implication des récepteurs α 1 et de la voie de signalisation PKC dans la régulation de la sAHP par la NA et quel est leur rôle par rapport aux RA- β .

Les récepteurs α ₁ et β adrénergiques étant tous largement exprimés dans les cellules pyramidales du néocortex (Milner et al., 1998 ; Nicholas et al., 1993b), le but de mon travail a été d'étudier *ex vivo* les effets des agonistes α 1 et β adrénergiques sur la sAHP dans les cellules pyramidales des couches **II** et **III** du cortex pariétal de souris.

Matériel et Méthodes

Dans le cadre de l'étude sur la contribution des récepteurs $\alpha 1$ et β noradrénergiques dans la modulation de la sAHP corticale, j'ai associé enregistrements électrophysiologiques et applications pharmacologiques sur tranches aiguës de cortex somatosensoriel chez la souris.

A. Préparation des tranches de cortex

Toutes les expériences ont été menées selon la directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 Novembre 1986 (86/609/EEC). Des souris C57BL/6 âgées de 14 à 22 jours ont été anesthésiées avec de l'isoflurane puis décapitées. Le cerveau a été rapidement prélevé et plongé dans un liquide céphalorachidien artificiel (LCRa) glacé (composition en mM : 125 NaCl ; 2.5 KCl ; 2 CaCl₂ ; 1 MgCl₂ ; 26 NaHCO₃ ; 1.25 NaH₂PO₄, 5 Na-pyruvate ; et 20 D-Glucose) et saturé en O₂/ CO₂ (95%/5%) contenant 1 mM acide kynurénique (antagoniste non spécifique des récepteurs du glutamate).

Les tranches coronales de cortex pariétal de 300 μ m d'épaisseur et contenant le cortex en tonneaux ont été préparées avec un vibratome (VT1000S, Leica) comme décrit précédemment (voir article présenté page 121). Après une heure d'incubation à température ambiante (20-25°C), les tranches ont été placées dans une chambre d'enregistrement du microscope droit à platine fixe (Olympus BX51 WI), thermostatée à 25°C (Minichamber I, Luigs and Neumann) et perfusées à un débit de 1-2 ml.min⁻¹ avec du LCRa¹³⁶ dépourvu d'acide kynurénique. Un seul enregistrement est réalisé par tranche.

B. Enregistrement par patch-clamp des cellules pyramidales corticales

Les enregistrements ont été réalisés sur des neurones des couches **II-III** du cortex pariétal. Leur soma triangulaire et leur dendrite apicale proéminente permettent d'identifier visuellement les cellules pyramidales (Kawaguchi, 1993) à l'objectif 60X (NA 0.90) par vidéomicroscopie infrarouge (Stuart et al., 1993) en utilisant un système de gradient de contraste Dodt (Luigs & Neumann, Dodt and Zieglgänsberger, 1998) (**Figure A**).

¹³⁶ LCRa : Liquide Céphalo-Rachidien artificiel

Les pipettes de patch ont été tirées à partir de capillaires en borosilicate de 1.5 mm de diamètre externe (TW150F-4, World Precision Instrument) avec une étireuse verticale (PP-83, Narishinge) afin d'obtenir une résistance comprise entre 3.5 et 6 M Ω . Elles ont été remplies avec 12 μ L de solution intracellulaire dont la composition en mM est la suivante : 130 KCH₃SO₃ ; 10 HEPES ; 5 MgCl₂ ; 5 phospho-créatine ; 4 ATPNa₂ ; 0.1 EGTA et 0.1 CaCl₂ pour l'étude en courant imposé et : 130 KCH₃SO₃ ; 10 HEPES ; 5 MgCl₂ ; 5 phospho-créatine ; 4 ATPNa₂ ; 1 5,5'dibromoBAPTA ; 0.1 CaCl₂ et 2mg/mL de biocytine pour l'étude en potentiel imposé ; osmolarité : 290 - 300 mosm/L ; pH : 7.2 - 7.3 (ajusté avec du KOH).

La pipette est délicatement approchée de la cellule d'intérêt avec une pression positive (**Figure A**). Après obtention d'un scellement de haute résistance (>2 G Ω), le passage en configuration cellule entière s'effectue par de brèves et légères succions. Les données électrophysiologiques sont enregistrées en utilisant les modes "V-clamp" et "I-clamp fast" de l'amplificateur (Axopatch 200B, MDS), filtrées à 5kHz et digitalisées à 50kHz grâce à une carte d'acquisition (Digidata 1440, MDS) connectée à l'ordinateur exécutant le logiciel pClamp 10.2 (MDS) puis sont analysées avec le logiciel Clampfit 10.3.

Les propriétés de décharge des neurones ont été vérifiées par l'injection de 9 créneaux de courant dépolarisant (1s) appliqués de + **100** à + **500 pA** avec **50 pA** d'incrément entre chaque créneau. Seules les cellules dont le potentiel de repos était inférieur ou égal à - **60 mV** ont été incluses dans l'étude. Les valeurs de potentiel ne sont pas corrigées pour le potentiel de jonction liquide (estimé à 9.7 mV pour la solution de KMet 0.1 EGTA).

La sAHP est évoquée par une injection de courant de **600 ms** et + **300 pA** à partir d'un potentiel de maintien à - **60 mV**, induisant un train de PA. Les enregistrements sont effectués toutes les minutes. Pour chaque enregistrement, la trace est ajustée par rapport à la ligne de base (*i.e* le potentiel de membrane moyen du neurone sur les 2 secondes précédant le début d'injection du courant). L'aire de la sAHP est alors mesurée entre **500 ms** et **1000 ms** après la fin du créneau de courant afin de minimiser la contamination par l'AHP moyenne (Satake et al., 2008) (**Figure 58.B**). Après application d'un composé pharmacologique, le changement de l'aire induit est calculé par l'équation : $((Y-X) / X) \times 100$, où X et Y désignent respectivement la moyenne des aires sur trois traces avant et

pendant le traitement. La NA et les agonistes ont parfois totalement éliminé la sAHP et généré une dépolarisation lente (sADP¹³⁷), l'aire de la sAHP a alors été fixée à zéro.

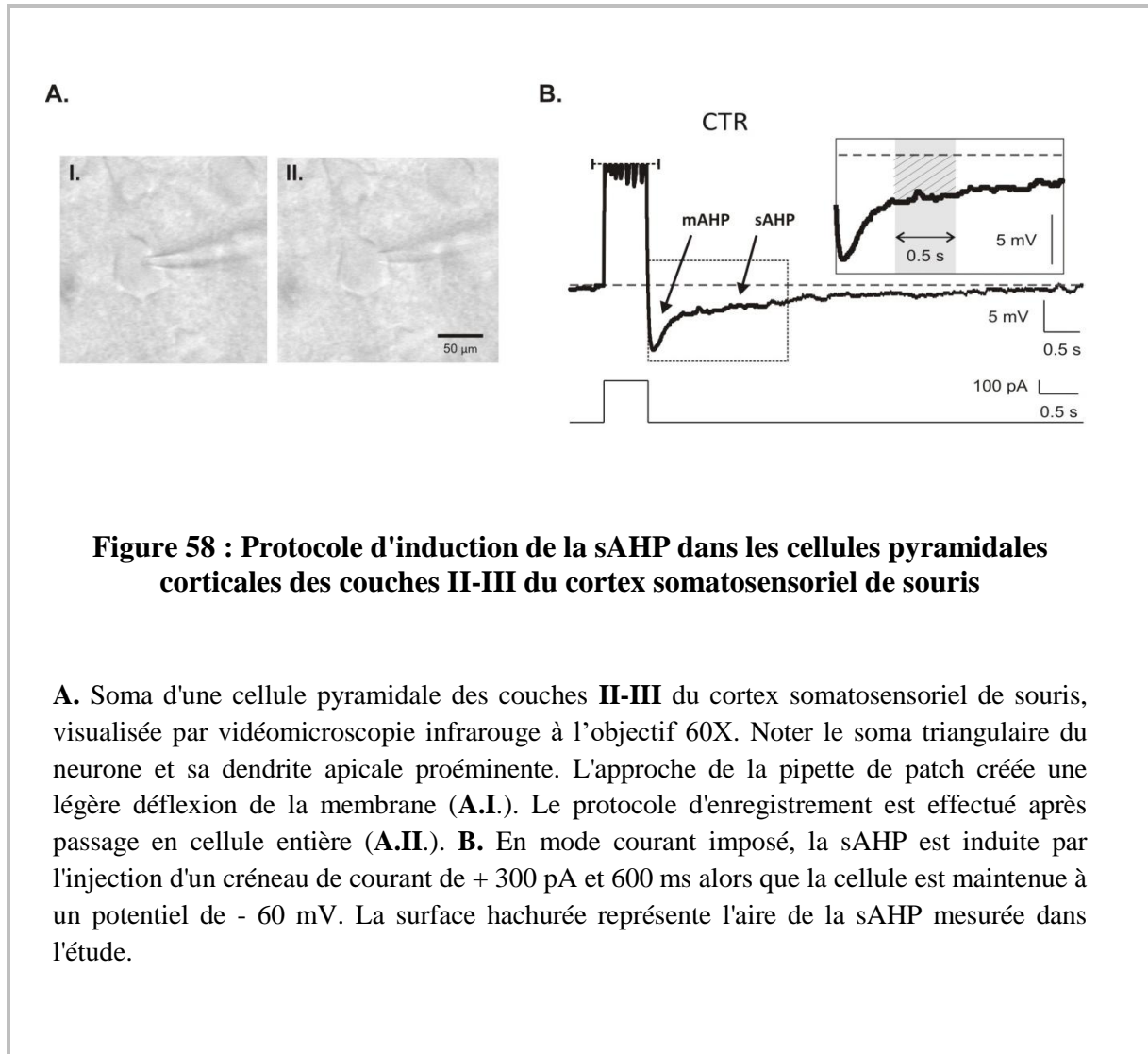


Figure 58 : Protocole d'induction de la sAHP dans les cellules pyramidales corticales des couches II-III du cortex somatosensoriel de souris

A. Soma d'une cellule pyramidale des couches **II-III** du cortex somatosensoriel de souris, visualisée par vidéomicroscopie infrarouge à l'objectif 60X. Noter le soma triangulaire du neurone et sa dendrite apicale proéminente. L'approche de la pipette de patch crée une légère déflexion de la membrane (**A.I.**). Le protocole d'enregistrement est effectué après passage en cellule entière (**A.II.**). **B.** En mode courant imposé, la sAHP est induite par l'injection d'un créneau de courant de + 300 pA et 600 ms alors que la cellule est maintenue à un potentiel de - 60 mV. La surface hachurée représente l'aire de la sAHP mesurée dans l'étude.

Le courant d'AHP lente (I_{sAHP}) est induit par un train de 40 créneaux dépolarisants de -60 à + 20 mV d'une durée de 3 ms chacun, sur une durée totale de 500 ms (soit une fréquence de 80 Hz). Avant l'acquisition, les neurones sont maintenus 5 minutes à un potentiel de - 60 mV pour permettre au dibromoBAPTA contenu dans la pipette de patch de diffuser dans la cellule (Lancaster and Batchelor, 2000). Les enregistrements sont effectués

¹³⁷ sADP : *slowAfterHyperPolarization*

toutes les 30 secondes. IsAHP est distingué de ImAHP par son décours temporel et son insensibilité à l'apamine (Faber and Sah, 2002; Schwandt et al., 1988b). Afin de ne pas être contaminé par la mAHP, l'aire d'IsAHP (ou Q AHP) a été mesurée entre 300 ms et 3000 ms après la fin du train dépolarisant (Andrade et al., 2012). Après application d'un composé pharmacologique, l'aire finale est donnée en % de l'aire initiale par l'équation : $(Y/X) \times 100$, où X et Y désignent respectivement la moyenne des aires sur trois traces avant et pendant le traitement pharmacologique.

La résistance d'accès a été mesurée au cours des enregistrements, les cellules dont la résistance d'accès était supérieure à 25 M Ω ou évoluait de ± 20 % en enregistrement ont été écartées de l'analyse.

C. Statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM¹³⁸ et le nombre de cellules est annoté par n. Un test de Wilcoxon a été effectué pour les comparaisons de données appariées, un test de Mann-Whitney a été réalisé pour les comparaisons de 2 groupes indépendants et une ANOVA de Kruskal-Wallis suivie d'un test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni ont été appliqués pour les comparaisons de trois groupes ou plus ; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$. ; *** = $p < 0.001$

D. Pharmacologie

Les composés pharmacologiques suivants : (-) isoprotérénol hypochloride, R (-) phényléphrine hypochloride, (-) norépinéphrine bitartrate salt hydrate et prazosin hydrochloride proviennent de chez Sigma-Aldrich. Le Dibromo BAPTA a été commandé chez Invitrogen.

Ces composés ont été aliquotés à des concentrations stocks dans de l'H₂O à l'exception de la FSK, du CGP 20172 et du U-73122 qui ont été préparés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et stockés à - 20°C. Ils ont été administrés par dissolution aux

¹³⁸ SEM : *Standard Error of the Mean*

concentrations données dans la solution de LCRA. La concentration finale en DMSO n'a jamais dépassé 0.1%. Pour minimiser la dégradation de la NA, des solutions stock de 10 mM ont été préparées extemporanément dans de l'eau distillée et dissoutes à la concentration désirée dans le LCRA immédiatement avant administration.

E. Révélation du marquage à la biocytine et immunofluorescence

Après les enregistrements électrophysiologiques, les tranches sont maintenues 20 min dans du LCRA oxygéné pour assurer une bonne diffusion de la biocytine dans l'arbre dendritique et axonal. Les tranches sont ensuite fixées à 4°C durant la nuit, par immersion dans du tampon phosphate à 0.1 M contenant 4% de paraformaldéhyde. Après fixation, les tranches sont lavées 4 fois dans du tampon phosphate salin (PBS) puis perméabilisées et saturées par incubation d'une heure à température ambiante dans du PBS avec 0.25% de Triton X100 et 0.2% de gélatine de saumon (Sigma, PBS-GT). Les tranches sont alors incubées 3 h en présence de streptavidine marquée à l'AlexaFluor 488 (1/400^{ème}, Invitrogen) diluée dans du PBS-GT. Après 5 lavages de 5 min au PBS, les tranches sont montées entre lame et lamelle dans un milieu aqueux (Vectashield, Vector Laboratories) puis observées au microscope à effet confocal (SP1, Leica) à l'objectif 40X.

Résultats

Dans cette étude électrophysiologique, la contribution des RA- α 1 et β dans la modulation de la sAHP des cellules pyramidales a été évaluée grâce à l'utilisation d'agonistes spécifiques de chaque sous-type de récepteurs. Les concentrations ont été établies d'après les données de la littérature (Madison and Nicoll, 1986a). Ainsi, la phényléphrine, agoniste des RA- α 1, a été appliquée à une concentration de 10 μ M et l'isoprotérénol, agoniste des RA- β , à une concentration de 1 μ M.

Les enregistrements ont été obtenus à partir de cellules pyramidales corticales identifiées visuellement dans les couches **II-III** du cortex pariétal. Ces cellules présentaient un profil de décharge dit "habituel" ou RS (McCormick et al., 1985) en réponse à l'injection d'un courant dépolarisant, avec une adaptation de la fréquence de décharge (**Figure 59.B**).

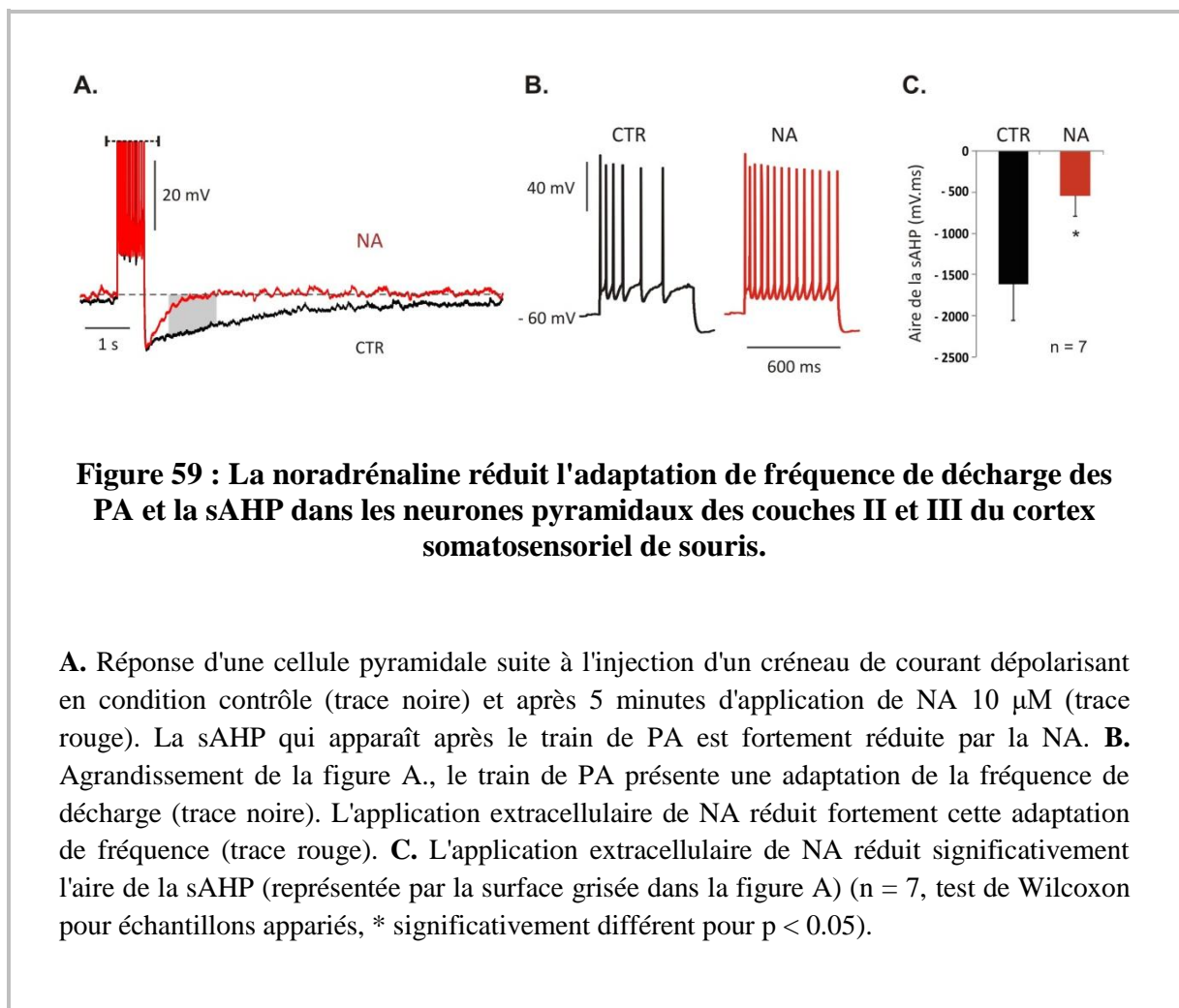
Les neurones inclus dans cette étude possèdent des potentiels de repos inférieurs à - 60 mV (moyenne de -76.8 ± 0.9 mV pour les enregistrements en courant imposé, n = 32).

I. L'effet de la NA sur la sAHP ne passe pas uniquement par l'activation des récepteurs β adrénergiques

Le but de cette étude a été d'examiner les effets individuels et combinés des agonistes RA- α 1 et RA- β sur la sAHP des cellules pyramidales des couches **II** et **III**. Le nombre de cellules testées est le suivant : agoniste β , n = 10 ; agoniste α 1, n = 9 ; agonistes $\beta + \alpha$ 1, n = 6. Le nombre de cellules examinées pour quantifier l'effet de la NA sur l'inhibition de la sAHP s'élève à n = 7. Cette dernière est appliquée à la concentration de 10 μ M, (Lancaster and Batchelor, 2000). Chaque composé pharmacologique ou combinaison de composés est testé séparément sur une cellule et une nouvelle tranche est utilisée pour chaque application.

A. Inhibition de la sAHP par la NA (10 μ M)

L'injection d'un créneau de courant dépolarisant dans les cellules pyramidales des couches **II** et **III** génère un train de potentiels d'actions présentant une adaptation de fréquence marquée (**Figure 59.B., trace de gauche**). L'application extracellulaire de noradrénaline (10 μ M) réduit amplement cette adaptation de fréquence de décharge (**Figure 59.B. trace de droite**).



La perfusion de NA (10 μ M) provoque une inhibition de la sAHP se traduisant par une réduction de l'aire de la sAHP de 70.2 ± 12.1 % (n = 7 ; p = 0.017961) (**Figures 59.A. et C. ; Figure B**). Dans certaines cellules (3 sur 7), la NA provoque une suppression complète de

la sAHP (réduction de l'aire de 100%) associée à une dépolarisation lente de la membrane ou sADP. Dans ce cas, l'aire de la sAHP a été arbitrairement fixée à zéro.

B. Effet significatif des agonistes des RA- α 1 et β adrénergiques sur la sAHP

Afin d'évaluer la contribution des récepteurs β et α 1 noradrénergiques dans l'inhibition de la sAHP par la NA, deux agonistes spécifiques ont été utilisés (l'isoprotérénol (1 μ M) et la phényléphrine (10 μ M) respectivement).

L'application d'isoprotérénol (ISO) seul, de phényléphrine (PHE) seule, ou des deux composés simultanément, provoque une réduction la sAHP (**Figures A.II., A.III. et A.IV.**) qui se traduit par une réduction de l'aire de la sAHP de 21.1 ± 7 % ISO (n = 9 ; p = 0.007686) ; 34.8 ± 7 % PHE (n = 9 ; p = 0.007686) ; et 49.1 ± 15 % ISO + PHE (n = 7 ; p = 0.017961) respectivement (**Figure 60.B.**). De manière similaire à l'application de NA, une suppression complète de la sAHP (réduction de l'aire de 100%) associée à une dépolarisation lente de la membrane ou sADP a été observée dans un tiers des cellules (2 sur 6) lors de l'application simultanée des deux agonistes adrénergiques. Dans ce cas, comme précédemment, l'aire de la sAHP a été arbitrairement fixée à zéro.

Les effets obtenus avec les différents composés pharmacologiques ont été comparés à la NA. Aucune différence n'a été mise en évidence entre la réduction de la sAHP induite par la NA et la co-application ISO + PHE (p = 0.259324). Bien que la PHE ait tendance à réduire moins fortement la sAHP que la NA (p = 0.031119), le seuil de significativité n'est pas atteint après la correction nécessaire aux comparaisons multiples. L'effet de l'ISO en revanche est significativement plus faible que la NA (p = 0.003322) (**Figure 60.B.**).

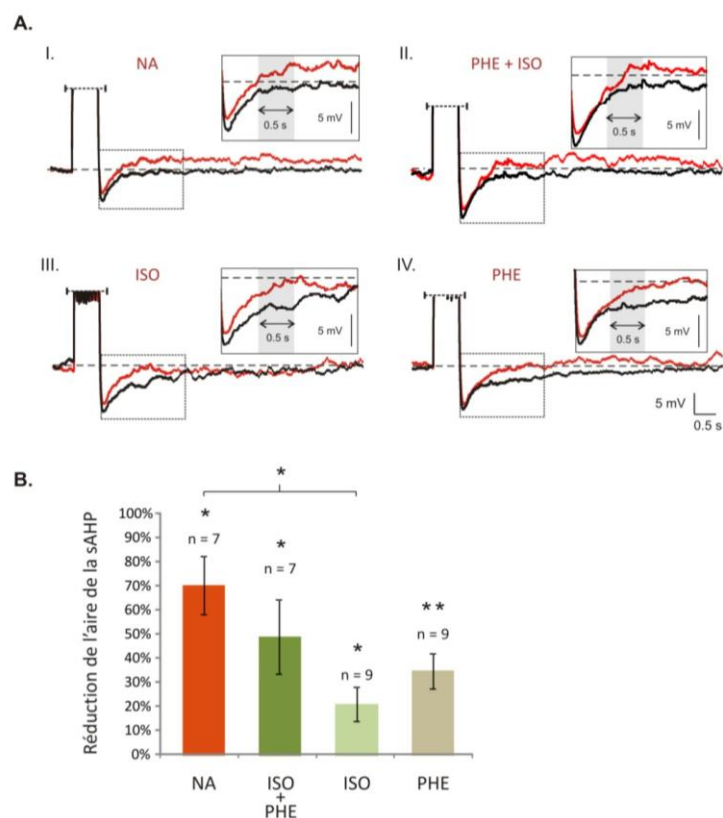


Figure 60 : Inhibition de la sAHP induite par différents agonistes adrénergiques

A. En potentiel imposé, la sAHP induite par l'injection d'un créneau de courant de 600 ms et 300 pA dans des neurones maintenus à -60 mV (traces noires). La sAHP est inhibée après 5 minutes d'application d'agonistes noradrénergiques (Traces rouges) : A.I. : NA (10 μ M) ; A.II. : ISO (1 μ M) + PHE (10 μ M) ; A.III. ISO (1 μ M) ; A.IV. : PHE (10 μ M). L'aire est mesurée sur un intervalle de 500 ms (zone grisée de l'agrandissement représenté en haut à droite de chaque tracé). Une sADP a pu être visualisée après l'application simultanée d'ISO + PHE ou de NA (A.I. et A.II, traces rouges). **B.** Histogramme de réduction de l'aire de la sAHP mesurée entre 500 ms et 1000 ms après la fin de l'injection de courant. L'application d'ISO seul, de PHE seule ou d'ISO + PHE réduit significativement l'aire de la sAHP (test de Wilcoxon pour échantillons appariés, significatif pour $p < 0.05$, * et $p < 0.01$, **). La comparaison des différents groupes révèle une différence significative entre l'effet de l'ISO et celui de la NA (significatif pour $p < 0.005$ *, ANOVA de Kruskal-Wallis suivie d'un test U de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni). **CTR** : Contrôle ; **NA** : Noradrénaline ; **ISO** : Isoprotérénol ; **PHE** : Phényléphrine.

Ces résultats suggèrent que l'activation des récepteurs β n'est pas suffisante pour expliquer à elle seule l'effet de la NA sur la sAHP et que l'intervention des récepteurs $\alpha 1$ est nécessaire. La co-application des agonistes provoque une réduction équivalente à la somme des réductions provoquées par les applications seules traduisant un effet additif des agonistes sur la sAHP ($49.1 \pm 15 \% \text{ ISO} + \text{PHE}$; $21.1 \pm 7 \% \text{ ISO}$ et $34.8 \pm 7 \%$).

II. Les agonistes $\alpha 1$ et β adrénérgiques ont un effet complémentaire sur IsAHP

Le but de cette approche a été de caractériser les effets individuels et simultanés des agonistes RA- $\alpha 1$ et RA- β sur le courant de sAHP (I_{sAHP}) dans les cellules pyramidales des couches **II** et **III** du cortex somatosensoriel de souris.

Les travaux menés sur la sAHP par Lancaster et Batchelor ont mis en évidence qu'un chélateur calcique particulier, le dibromoBAPTA, favorisait le développement du courant sortant IsAHP (Lancaster and Batchelor, 2000). L'EGTA contenu dans la solution intracellulaire lors des enregistrements en courant imposé a donc été remplacé par 1mM de dibromoBAPTA pour réaliser les enregistrements en potentiel imposé.

IsAHP a été induit par l'injection intracellulaire d'un train de 40 créneaux dépolarisants de -60 mV à +20 mV à une fréquence de 80 Hz, sur une durée totale de 300 ms dans des cellules pyramidales maintenues à un potentiel de membrane de -60 mV (**Figure 61.B**). Afin de ne pas être contaminé par la mAHP (Andrade et al., 2012), l'aire de IsAHP (que nous appellerons par la suite Q AHP) est mesurée 300 ms après la fin du créneau dépolarisant. De la même manière que précédemment, chaque composé pharmacologique ou combinaison de composés a été testé séparément sur une seule cellule par tranche. Un total de 69 cellules enregistrées a été sélectionné et sera présenté ci-après.

Le courant IsAHP enregistré en configuration cellule entière présente une décroissance marquée du cours du temps (**Figures 61 A. et B.**).

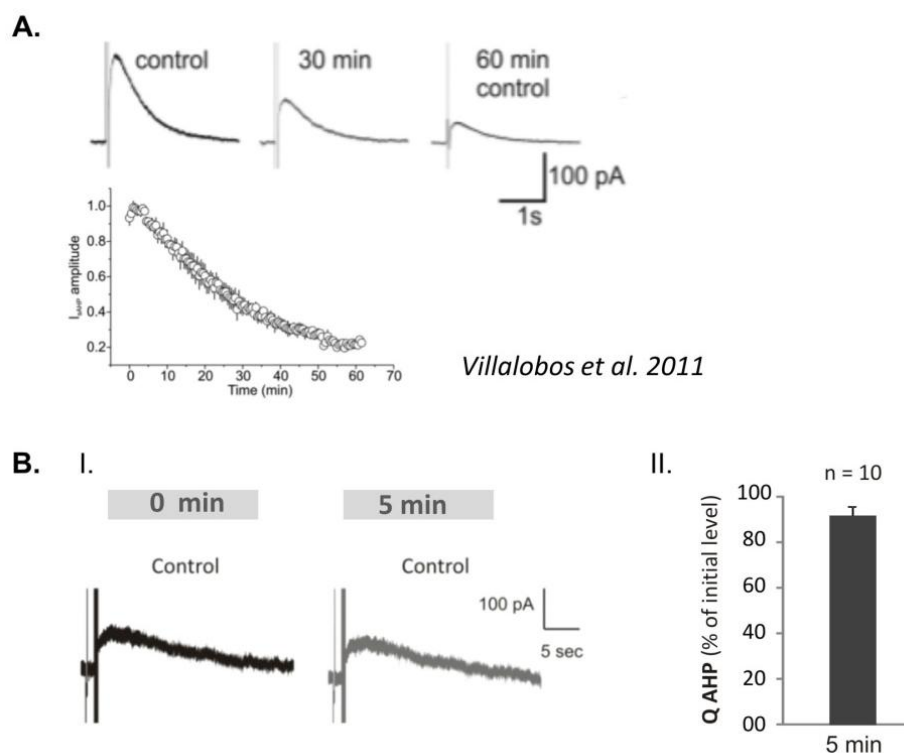


Figure 61 : Dans les cellules pyramidales, l'amplitude du courant IsAHP décroît au cours du temps

A. Traces d'un enregistrement illustrant la décroissance de IsAHP dans une cellule pyramidale de la couche **V** à différents temps après le passage en cellule entière (haut). Tracé illustrant la décroissance moyenne de IsAHP sur 6 cellules pyramidales de la couche **V** (bas) (*Adapté de (Villalobos et al., 2011)*). **B.** Traces d'un enregistrement illustrant la décroissance de IsAHP dans une cellule pyramidale des couches **II** et **III** à différents temps après le passage en cellule entière (B.I.). Histogramme représentant la valeur de Q AHP (en % du niveau initial) après 5 minutes d'enregistrement n = 10 (B.II.).

Les données récoltées par Andrade et son équipe, illustrées dans la figure **A**, montrent que l'amplitude de IsAHP diminue de 80 % en une heure d'enregistrement sans que sa cinétique ne soit pour autant affectée (Villalobos et al., 2011). De la même manière, une diminution de Q sAHP a pu être observée dans nos conditions d'enregistrement.

L'histogramme de la figure **B. II.** Représente Q AHP moyenne après 5 minutes d'enregistrement, en % de la valeur initiale, soit $91.5 \pm 3.8 \%$ ($n = 10$) (**Figure B.II**). Ce phénomène est à prendre en compte car il pourrait conduire à de fausses interprétations quant à l'effet d'un composé. Afin de pallier ce problème, les aires obtenues après 5 minutes d'applications pharmacologiques seront comparées à l'aire que présente IsAHP après le même délai d'attente en condition contrôle.

A. Inhibition de IsAHP par des concentrations croissantes de NA

Trois concentrations de NA ont été appliquées afin d'évaluer leur effet sur IsAHP (**Figure 62.A.**). L'application en bain de NA 50 nM conduit à une Q AHP à $80.4 \pm 4.3 \%$ de sa valeur initiale ($n = 5$) et aucune différence n'est observée avec la valeur de Q AHP observée en condition contrôle ($p = 0.075258$) (**Figure 62.B.**). A 100 nM et 10 μ M de NA en revanche, la Q AHP est réduite de façon dose-dépendante avec un effet maximal obtenu pour 10 μ M. L'histogramme de la figure B présente les valeurs obtenues pour Q AHP après 5 minutes d'application (en % du niveau initial) : NA 100 nM, 57.9 ± 6.4 ($n = 9$, $p = 0.000183$) ; NA 10 μ M, 27.0 ± 6.8 ($n = 12$; $p = 0.000003$).

Au vu de ces résultats et des concentrations habituellement utilisées par les équipes travaillant sur le sujet (Guan et al., 2015 ; Madison and Nicoll, 1986a ; Satake et al., 2008) la concentration de 10 μ M a été conservée pour la suite de l'étude.

Il faut noter que la NA provoque également une forte réduction du courant tonique (**Figure 62.A.III. et VI.**). Cependant un grand nombre de conductances sont susceptibles d'y être impliquées (en plus de celles responsables de IsAHP), nous avons donc choisi de travailler uniquement sur les variations de l'aire QAHP (mesurée comme décrite précédemment).

B. Effet noradrénergique indépendant du réseau neuronal alentour

L'ajout d'antagonistes des récepteurs ionotropes glutamatergiques (CNQX 10 μM et APV 25 μM) et GABAergiques (Gabazine 10 μM) lors de l'application en bain de NA (10 μM) résulte d'une inhibition de IsAHP (**Figure 63.A.**) se traduisant par une réduction significative de Q AHP ($p = 0.000046$). En effet, après 5 minutes d'application pharmacologique, celle-ci atteint 36.8 ± 5.3 % de sa valeur initiale ($n = 8$) contre 91.5 ± 3.8 % en condition contrôle ($n = 10$) (**Figure 63.B.**). Aucune différence n'est détectée entre l'effet inhibiteur de la NA seule et lorsqu'elle est co-appliquée avec les dits antagonistes ($p = 0.383742$) (**Figure 63.B.**).

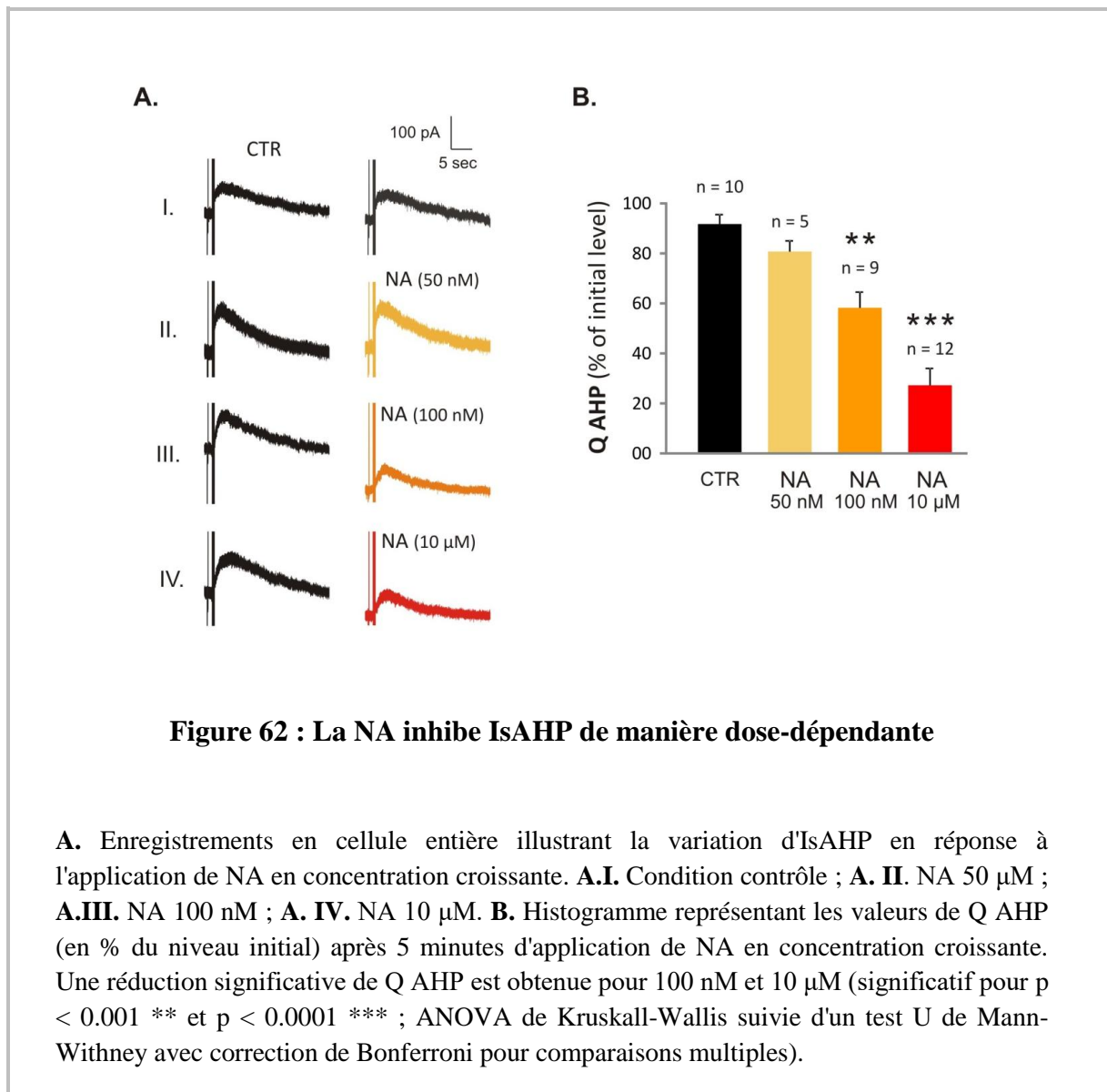


Figure 62 : La NA inhibe IsAHP de manière dose-dépendante

A. Enregistrements en cellule entière illustrant la variation d'IsAHP en réponse à l'application de NA en concentration croissante. **A.I.** Condition contrôle ; **A. II.** NA 50 μM ; **A.III.** NA 100 nM ; **A. IV.** NA 10 μM . **B.** Histogramme représentant les valeurs de Q AHP (en % du niveau initial) après 5 minutes d'application de NA en concentration croissante. Une réduction significative de Q AHP est obtenue pour 100 nM et 10 μM (significatif pour $p < 0.001$ ** et $p < 0.0001$ *** ; ANOVA de Kruskal-Wallis suivie d'un test U de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni pour comparaisons multiples).

Ces résultats confirment que la modulation de IsAHP par la NA ne peut pas être attribuée à un effet du réseau. L'inhibition de IsAHP par la NA résulte donc d'une modification des propriétés intrinsèques des cellules.

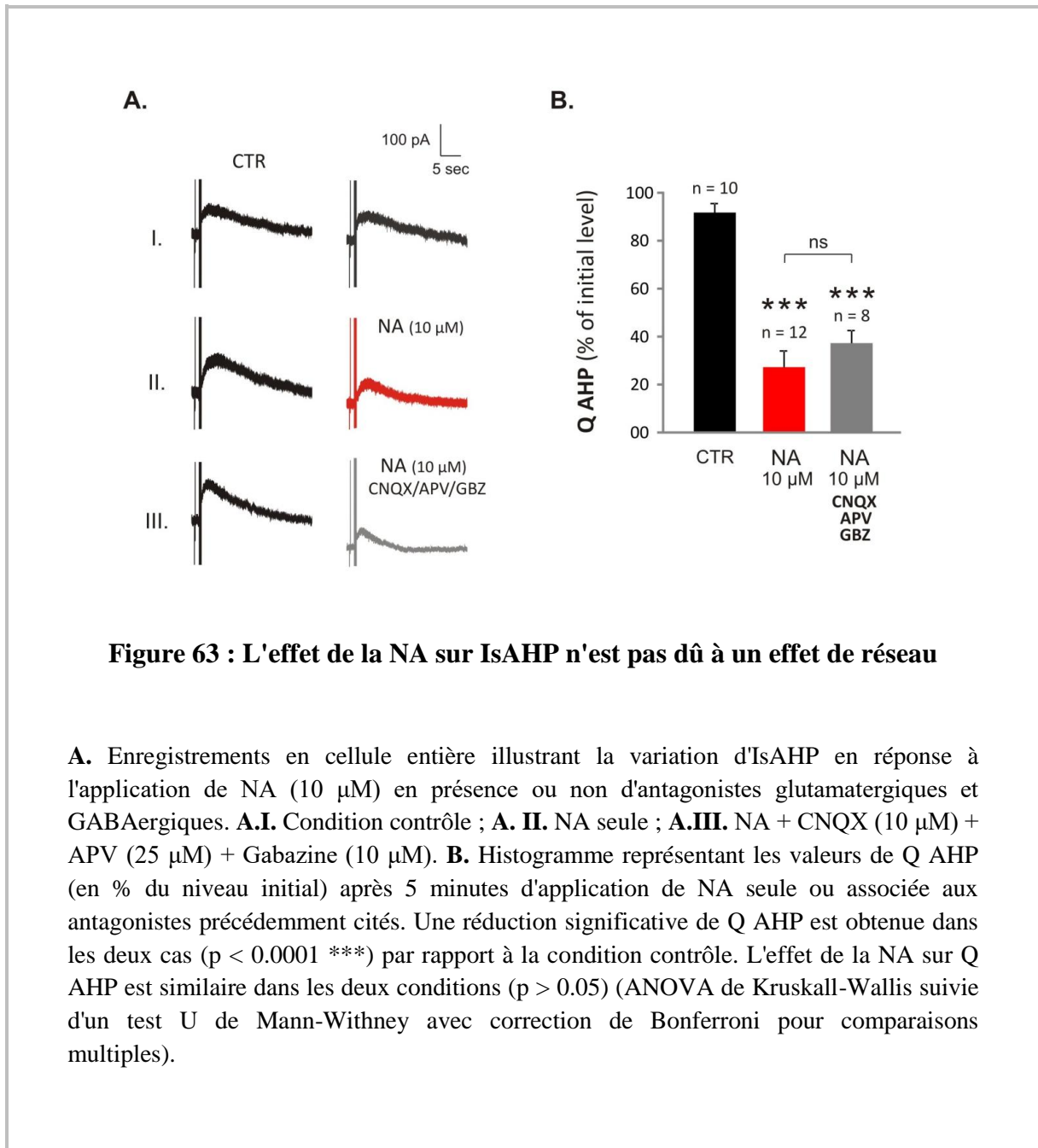


Figure 63 : L'effet de la NA sur IsAHP n'est pas dû à un effet de réseau

A. Enregistrements en cellule entière illustrant la variation d'IsAHP en réponse à l'application de NA (10 μM) en présence ou non d'antagonistes glutamatergiques et GABAergiques. **A.I.** Condition contrôle ; **A. II.** NA seule ; **A.III.** NA + CNQX (10 μM) + APV (25 μM) + Gabazine (10 μM). **B.** Histogramme représentant les valeurs de Q AHP (en % du niveau initial) après 5 minutes d'application de NA seule ou associée aux antagonistes précédemment cités. Une réduction significative de Q AHP est obtenue dans les deux cas ($p < 0.0001$ ***) par rapport à la condition contrôle. L'effet de la NA sur Q AHP est similaire dans les deux conditions ($p > 0.05$) (ANOVA de Kruskal-Wallis suivie d'un test U de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni pour comparaisons multiples).

C. Effet complémentaire des agonistes $\alpha 1$ et β adrénergiques sur IsAHP

Les effets des agonistes $\alpha 1$ et β noradrénergiques sur IsAHP ont été testés seuls ou en co-application (**Figure 64.A.**). Les trois protocoles conduisent à une inhibition de IsAHP se traduisant par une réduction significative de Q AHP (**Figure 64.B.**).

Après 5 minutes d'application d'ISO (1 μ M), Q AHP atteint 63.1 ± 5.2 % de sa valeur initiale ($n = 8$; $p = 0.011719$), contre 74.1 ± 8.0 % sous PHE (10 μ M) ($n = 8$; $p = 0.011719$) et 41.2 ± 5.3 % sous ISO + PHE ($n = 9$; $p = 0.007686$) (**Figure 64B.**).

La comparaison des effets obtenus pour chaque type d'application pharmacologique, révèle qu'individuellement, l'isoprotérénol et la phényléphrine réduisent significativement moins Q AHP que la NA (**Figure 64.B.II.** ; $p = 0.001064$ et $p = 0.000302$ respectivement). Cependant, il n'y a plus de différence avec la NA lorsque les deux agonistes sont appliqués simultanément (**Figure 64.B.II.** ; $p = 0.310026$). Lorsqu'ils sont co-appliqués, les deux agonistes agissent de manière additionnelle et provoquent un effet similaire à la NA.

La stimulation des récepteurs β seuls n'inhibe pas Q AHP aussi fortement que le fait la NA. Si nos résultats confirment que les récepteurs β sont impliqués dans la modulation de IsAHP en réponse à la NA, ils révèlent également que leur seule stimulation n'est pas suffisante pour produire l'effet noradrénergique complet. Puisque la costimulation des récepteurs $\alpha 1$ et β inhibe Q AHP d'une manière similaire à la NA, il semble que les deux types de récepteurs interviennent dans la modulation de la sAHP. Enfin, l'effet additionnel des deux agonistes suggère une complémentarité des voies de signalisation intracellulaires de la PKA et du PIP2.

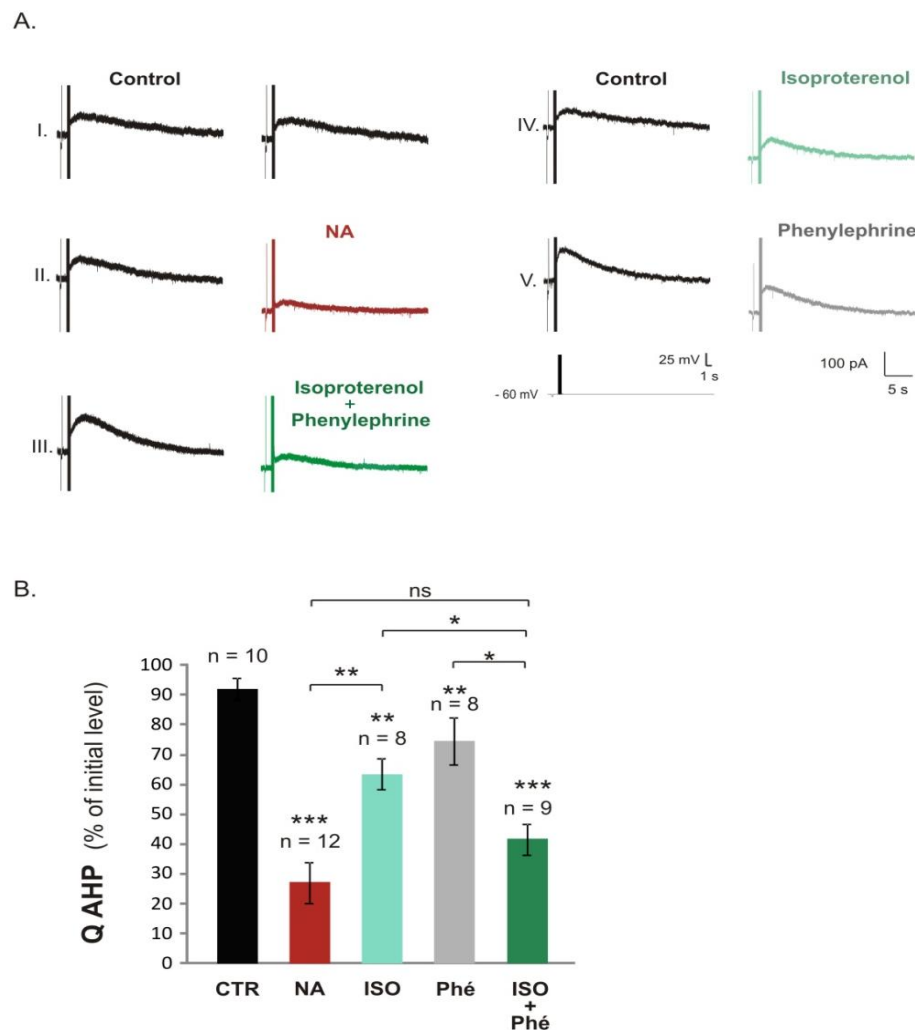


Figure 64 : Inhibition de IsAHP par les agonistes $\alpha 1$ et β adrénergiques

A. Enregistrements en cellule entière illustrant la variation d'IsAHP en réponse à l'application de différents agonistes noradrénergiques. **A.I.** Condition contrôle ; **A. II.** NA (10 μ M) ; **A.III.** ISO (1 μ M) + PHE (10 μ M) ; **A. IV.** ISO (1 μ M) ; **A.V.** PHE (10 μ M). **B.** Histogramme représentant les valeurs de Q AHP (en % du niveau initial) après 5 minutes d'application des différents composés. Tous conduisent à une réduction significative de Q AHP par rapport à la condition contrôle. L'application isolée d'ISO et de PHE produit un effet significativement plus faible que la NA ou la co-application ISO + PHE. Aucune différence significative n'est détectée entre ces deux dernières conditions (droite). (ANOVA de Kruskal-Wallis suivie d'un test U de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni pour comparaisons multiples, significatif pour $p < 0.005$; $p < 0.001$ ** et $p < 0.0001$ ***).

Discussion

Si l'on se réfère aux études menées *in vitro* sur la modulation de l'excitabilité neuronale par la NA, on constate qu'une multitude d'effets a été rapportée (Dodt et al., 1991 ; Law-Tho et al., 1993 ; Wang et al., 2007). La NA génère par exemple des réponses membranaires significativement différentes dans les sous-catégories d'interneurons corticaux (Kawaguchi and Shindou, 1998). Cet ensemble d'observations n'est pas surprenant étant donné la grande diversité des conductances ioniques qui régulent collectivement la décharge des neurones (He et al., 2014 ; Llinás, 1988).

L'ensemble des résultats présenté ici a permis d'éclaircir le rôle des récepteurs $\alpha 1$ et β adrénergiques dans la modulation de la sAHP par la NA dans les neurones glutamatergiques des couches superficielles du néocortex.

Cependant, ces résultats doivent être remis dans un contexte plus global et donc plus complexe.

A. Implication des récepteurs β et $\alpha 1$ dans la modulation de la sAHP des pyramides des couches II et III du néocortex

Cette étude effectuée au niveau du cortex somatosensoriel confirme les données de la littérature quant au rôle des récepteurs β dans la régulation de la sAHP par la NA (Law-Tho et al., 1993; Madison and Nicoll, 1986a) et, par extension, de la PKA (Lancaster and Batchelor, 2000; Pedarzani and Storm, 1993).

Les récepteurs β ne semblent pas être les seuls impliqués. La réduction significative de la sAHP et du courant I_{sAHP} à la suite d'une application de phényléphrine révèle un rôle direct des RA- $\alpha 1$ dans la régulation de la sAHP au niveau des couches II et III du néocortex. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montrent que la voie de signalisation des PLC joue un rôle dans le maintien de la sAHP (Villalobos et al., 2011) et sont renforcés par le fait que l'activation d'autres récepteurs couplés aux protéines Gq diminuent significativement l'amplitude d' I_{sAHP} (Krause et al., 2002 ; Melyan et al., 2002).

B. Effet additif des RA- β et $\alpha 1$

Une interaction entre les RA- α et β dans la régulation de la sAHP a déjà été démontrée dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Pedarzani and Storm, 1996). D'après cette étude, les agonistes α renforcent fortement l'effet des agonistes β lors d'application simultanée par un mécanisme synergique dépendant de l'AMPC. Ce mécanisme n'a pas été mis prouvé dans les cellules pyramidales des couches **II** et **III** du néocortex.

Nos résultats révèlent un effet additif de l'isoprotérénol et la phényléphrine sur IsAHP. Cette observation est confortée par une publication de Pedarzani et al. qui fait valoir un rôle des protéines Gq dans la régulation de la sAHP et ce, indépendamment des RA- β adrénergiques (Krause et al., 2002). Leurs travaux suggèrent une intervention distincte des deux voies de signalisations PKA et PLC dans la modulation de la sAHP. Ainsi, la modulation de la sAHP par la NA serait le fruit d'une coopération entre les RA- $\alpha 1$ et β .

De façon intéressante, Storm et son équipe ont réalisé une étude très similaire dans les cellules pyramidales de l'hippocampe. Ils ne détectent aucun effet direct d'un agoniste des RA- α sur IsAHP (Pedarzani and Storm, 1996). Ceci peut s'expliquer par le manque de spécificité du composé utilisé par rapport à la phényléphrine ou par une modulation différentielle de la sAHP selon les couches corticales et/ou le type cellulaire tel qu'il a été exposé au sein des cellules pyramidales de la couche **V** (Guan et al., 2015).

C. Hétérogénéité de la sAHP

De la même manière que dans les cellules pyramidales des couches corticales profondes (Guan et al., 2015) ou de l'hippocampe (Madison and Nicoll, 1986a), une grande diversité de l'amplitude des sAHP a été constatée au sein des cellules pyramidales des couches **II-III**. Si on ajoute à cette observation l'hétérogénéité des réponses des cellules pyramidales à la NA (Guan et al., 2015), il n'est pas surprenant que nous observions un coefficient de variation aussi important pour les aires enregistrées en mode courant imposé (*i.e.* 197 %).

L'hétérogénéité des réponses obtenues en courant imposé peut également s'expliquer par l'apparition occasionnelle d'une dépolarisation post-PA lente (sADP) (dans un tiers des cellules sous NA et ISO + PHE). Le remplacement de la sAHP par une sADP en réponse à la NA a déjà été dégagé dans des études antérieures (Haj-Dahmane and Andrade, 1998; Schwindt et al., 1988b). A la différence de la sAHP, la sADP n'est pas présente à l'état basal. Elle apparaît uniquement en réponse à l'application d'agonistes de neuromodulateurs comme la NA, la sérotonine ou l'acétylcholine (Schwindt et al., 1988a).

1. Génération d'une sADP

Notre protocole d'enregistrement ne nous permet pas de savoir si seulement un tiers des cellules génère effectivement une sADP ou si elle est présente dans toute les cellules enregistrées mais le plus souvent masquée par la sAHP. Effectivement, la sADP recouvre temporellement la sAHP (Schwindt et al., 1988a) ; elle n'est donc détectable que lorsque les courants entrants responsables de la sADP excèdent les courants sortants responsables de la sAHP.

Il est donc possible que la réduction de l'aire de la sAHP observée à la suite d'une application des différents agonistes noradrénergiques soit en partie due à l'émergence d'une sADP. Ainsi, la répercussion additive des RA- α 1 et β que nous observons pourrait résulter de deux mécanismes distincts : l'inhibition de la sAHP d'une part et la genèse d'une sADP d'autre part.

2. Rôle des RA- α 1 sur IsAHP ou IsADP ?

Le rôle des récepteurs α 1 dans la genèse d'une sADP a déjà été démontré dans les cellules pyramidales de la couche V du cortex préfrontal (Araneda and Andrade, 1991). Une hypothèse simple serait donc que l'activation d'un type de récepteur adrénergique (RA- β) inhibe le courant potassique sortant, responsable de la sAHP tandis que l'activation du second récepteur (RA- α 1) conduise à un courant cationique entrant, générant une sADP.

Cependant, il a été dégagé que l'application intracellulaire de myo-inositol (précurseur du PIP₂) ou la surexpression de PIP₅K (enzyme assurant la synthèse du PIP₂ membranaire) préservait l'amplitude de la sAHP d'une dérive progressive au cours du temps (Villalobos et al., 2011). Des études antérieures ont prouvé qu'un certain niveau de PIP₂ membranaire était nécessaire à l'ouverture de nombreux canaux ioniques dont des canaux potassiques de type Kv7 (Delmas et al., 2005 ; Suh and Hille, 2005). L'hydrolyse du PIP₂ membranaire, suite à l'activation des RA- α 1 et de la PLC, pourrait provoquer une diminution de la sAHP. S'il est clair que les RA- α 1 jouent un rôle dans la genèse d'une sADP on ne peut exclure qu'ils interviennent également sur le courant sortant responsable de la sAHP.

Des études complémentaires seront nécessaires pour séparer les deux courants lents opposés et déterminer si l'effet additif observé s'opère via la genèse d'une sADP.

La sADP sous-tendue par la NA impliquant principalement les ions sodium (Haj-Dahmane and Andrade, 1998), il serait judicieux de s'affranchir de la sAHP en se plaçant au niveau du potentiel d'inversion du potassium et de vérifier si la stimulation des RA- α 1 et non des RA- β conduit bien à l'apparition d'un courant entrant de type IsADP. En plus de confirmer le rôle spécifique des RA- α 1 dans la genèse de la sAHP, ce protocole permettrait de distinguer clairement si l'ensemble des cellules pyramidales des couches **II** et **III** présentent une sADP ou uniquement une sous-population (une autre alternative serait de remplacer le potassium de la solution intracellulaire par du césium).

3. Répartition des deux sous-types de récepteurs

Les travaux d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont amplement détecté les RA- β 1 (Lorton and Davis, 1987 ; Nicholas et al., 1993b ; Paschalis et al., 2009 ; Rainbow et al., 1984) et les RA- α 1 (Day et al., 1997 ; McCune et al., 1993 ; Pieribone et al., 1994) dans les couches **I-III** du néocortex. Ces données sont confirmées par la forte détection des transcrits du RA- β 1 et la distribution plus faible et plus hétérogène des RA- α 1 dans les cellules pyramidales des couches **II-III** du cortex visuel de souris adultes obtenues par

séquençage d'ARN sur cellule unique (Day et al., 1997), les profils d'expression distincte pouvant se chevaucher dans certaines régions.

Si l'on se réfère aux études menées *in vitro* sur la modulation de l'excitabilité neuronale par la NA, il a été constaté que l'activation des récepteurs noradrénergiques provoque trois types de réponses différentes au niveau du potentiel de membrane des cellules pyramidales : une hyperpolarisation pure, une dépolarisation pure ou bien, dans la majorité des cas, une hyperpolarisation transitoire suivie du développement plus lent d'une dépolarisation (Madison and Nicoll, 1986a).

Ces données laissent supposer qu'une petite portion de cellules pyramidales ne posséderait qu'un seul sous-type de récepteur (RA- α ou RA- β) et que la majorité des cellules exprimeraient à la fois les deux sous-types de récepteurs dans des proportions différentes.

4. Quelles conductances seraient responsables de la sADP ?

L'activation des récepteurs muscariniques (Haj-Dahmane and Andrade, 1998) et 5-HT_{2A} (sous-type de récepteur sérotoninergiques) (Zhang and Arsenault, 2005) induisent IsADP dans les cellules pyramidales du mPFC de rat via l'activation de canaux cationiques non-sélectifs et dépendent du calcium (CAN).

Il est donc possible que l'induction de la sADP par la NA se fasse par l'activation des CAN via la voie de signalisation du phosphatidylinositol (PI) et de la protéine kinase C (PKC) découlant de l'activation des protéines Gq (Nicoll et al., 1990). Des études complémentaires seront nécessaires pour le déterminer.

La sAHP apparaît à la suite d'un train de PA et assure un rétrocontrôle négatif sur la décharge neuronale en empêchant le neurone d'atteindre trop rapidement le seuil de décharge (Madison and Nicoll, 1986a). La NA réduit l'amplitude de la sAHP et provoque une diminution de l'accommodation de fréquence de décharge dans les cellules pyramidales.

Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que la modulation de la sAHP par la NA fait intervenir l'action conjuguée des RA- β et $\alpha 1$ dans les cellules pyramidales des couches

II-III du cortex somatosensoriel et conforte le rôle du PIP2 membranaire dans le maintien de la sAHP (Villalobos et al., 2011).

Dans une proportion de cellules pyramidales restant à déterminer, cet effet semble renforcé par la mise en place d'une dépolarisation lente sous-tendue par l'activation des RA- α 1 (Madison and Nicoll, 1986a).

Les courants opposés IsAHP et IsADP présentent une cinétique similaire (Schwindt et al., 1988a) et l'absence d'outils pharmacologiques sélectifs rend leur distinction difficile. La contribution réelle des RA- α 1 sur l'inhibition du courant IsAHP devra donc être évaluée plus précisément.

Conclusion

La grande variabilité des réponses à la NA peut s'expliquer par une distribution hétérogène des RA à la surface des cellules pyramidales. Dans la couche **V** du néocortex, la NA affecte différemment l'excitabilité des cellules pyramidales à décharge régulière ou en bouffées suggérant une contribution spécifique de chacune d'elles dans la circuiterie corticale (Waterhouse et al., 2000).

Nos résultats indiquent que la transmission synaptique excitatrice des cellules à décharge habituelle des couches **II-III** du cortex somatosensoriel est facilitée par l'activation noradrénergique des RA- α 1 et β . L'action additive des RA- α 1 et β sur la sAHP et la sADP renforce la dépolarisation lente du potentiel de membrane et peut générer une activité de décharge soutenue dans les neurones excités (Schwindt et al., 1988a). Ces effets devraient contribuer à augmenter le ratio signal sur bruit supposé être une conséquence importante de l'influence noradrénergique sur les neurones corticaux

Contrairement aux couches profondes, les RA- β ne sont pas suffisants pour supprimer IsAHP dans les cellules pyramidales des couches **II-III**. La composante α 1 semble alors de première importance et n'intervient pas uniquement pour moduler l'excitabilité durant une soudaine activation noradrénergique maximale.

Les voies de signalisation en aval semblent interagir pour intégrer les signaux générés par les différents neurotransmetteurs (Tang and Gilman, 1991 ; Andrade, 1993 ; Bourne and Nicoll, 1993). La coopération entre les RA- α 1 et β mise en évidence ici et entre les voies de signalisation PLC et PKA pourrait intervenir entre différents neurotransmetteurs (Satake et al., 2008).

Annexe 1 :

**Les neurones corticaux exprimant la nNOS et NK1R sont
régulés par les projections cholinergiques du cerveau
antérieur basal**

Le traitement des informations au sein des circuits néocorticaux est basé sur des interactions complexes entre les activités des neurones glutamatergiques et GABAergiques. De nombreux neuromodulateurs comme le monoxyde d'azote (NO¹³⁹) interviennent dans la régulation de l'équilibre entre signaux excitateurs et inhibiteurs (Baraban and Tallent, 2004 ; Krimer and Goldman-Rakic, 2001 ; Somogyi and Klausberger, 2005). Ce dernier est produit à partir de dioxygène et de L-arginine par les enzymes NOS¹⁴⁰.

Les neurones exprimant la NOS neuronale (nNOS) seraient impliqués dans d'importants processus physiologiques comme le couplage neurovasculaire pour contrôler le débit sanguin cérébral (Cauli et al., 2004 ; Perrenoud et al., 2013) ou la régulation du sommeil (Kilduff et al., 2011).

L'article présenté ci-après a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Thomas S. Kilduff au Centre de Neurosciences SRI International à Menlo Park, en Californie. Il porte sur l'étude d'une population de neurones corticaux GABAergiques activés préférentiellement durant le sommeil (Gerashchenko et al., 2008 ; Morairty et al., 2013 ; Pasumarthi et al., 2010). Chez la souris, ces neurones expriment à la fois la nNOS et le récepteur NK1 de la substance P (Dittrich et al., 2012). Localisés majoritairement dans les couches profondes du cortex (Lee and Jeon, 2005 ; Smiley et al., 2000 ; Yan and Garey, 1997), ces neurones à nNOS/NK1 possèdent des projections étendues qui suggèrent une influence sur la circuiterie globale du cortex plutôt qu'un effet restreint au niveau de microcircuits locaux (Higo et al., 2007, 2009 ; Lee and Jeon, 2005 ; Tomioka and Rockland, 2007).

Dans une étude récente, nos collaborateurs ont montré que les neurones à nNOS/NK1 corticaux exprimaient préférentiellement le marqueur d'activité c-FOS durant le sommeil. Ils ont émis l'hypothèse d'une implication de ces interneurons dans la régulation homéostatique du sommeil (Kilduff et al., 2011).

Le cerveau antérieur basal (BF¹⁴¹) est une région sous-corticale impliquée dans le contrôle des cycles éveil-sommeil, l'activation corticale ou encore l'attention (Brown et al., 2012). Il

¹³⁹ NO : *Nitric Oxide*

¹⁴⁰ NOS : *Nitric Oxide Synthase*

¹⁴¹ BF : *Basal Forebrain*

est le principal centre de production d'acétylcholine dans le cerveau. Or, les neurones à nNOS corticaux reçoivent des afférences cholinergiques (Cauli et al., 2004 ; Dittrich et al., 2012). De plus, il a été mis en évidence que le BF projetait sur ces interneurons (Vaucher et al., 1997). Si l'acétylcholine exerce des effets variables sur les populations d'interneurones GABAergiques (Gulledge et al., 2007; Kawaguchi, 1997), la stimulation électrique du BF augmente l'expression de c-FOS dans les neurones à nNOS, suggérant qu'il exercerait un effet excitateur (Kocharyan et al., 2008).

Cette collaboration a été menée dans le but d'éclaircir les effets du système cholinergique sur la population de neurones à nNOS/NK1R corticaux chez la souris C57BL6.

Dans un premier temps, une approche optogénétique a permis de confirmer la composante cholinergique des projections du BF sur les neurones à nNOS/NK1R des couches corticales profondes. La stimulation optogénétique des terminaisons cholinergiques du BF a provoqué soit une activation, soit une inhibition des neurones à nNOS/NK1R s'expliquant en partie par un effet variable de l'activation des récepteurs nicotiques postsynaptiques.

L'utilisation de composés pharmacologiques a fait ressortir un rôle excitateur de l'acétylcholine via les récepteurs muscariniques postsynaptiques tandis que l'activation des récepteurs muscariniques M2 et M3 présynaptiques a réduit les entrées glutamatergiques sur les interneurons à nNOS/NK1R.

Ma contribution a consisté en la caractérisation moléculaire des neurones à nNOS/NK1R corticaux par RT-PCR sur cellule unique. Après avoir identifié et enregistré l'activité électrophysiologique de neurones à nNOS/NK1R des couches V et VI, les collaborateurs ont collecté leur cytoplasme. Pour chacun de ces neurones (n = 13), j'ai caractérisé le profil d'expression de 21 gènes incluant des marqueurs d'identité neuronale et différents sous-types de récepteurs nicotiques et muscariniques à l'acétylcholine.

L'analyse moléculaire a révélé une expression prédominante des sous-types M1, M3 des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine dans les neurones à nNOS/NK1R cohérentes avec les données électrophysiologiques obtenues par les collaborateurs qui ont observé une

forte réduction des courants cholinergiques évoqués dans les neurones à nNOS/NK1R en présence d'un antagoniste des récepteurs M1 et M3.

Les réponses engendrées par l'acétylcholine sont complexes. D'autres travaux seront nécessaires pour déterminer les dynamiques de réseau qui gouvernent l'équilibre entre la signalisation cholinergique, l'activité des neurones à nNOS/NK1R et la synchronisation corticale (impliquant également d'autres systèmes de neurotransmetteurs).

ORIGINAL ARTICLE

Cortical nNOS/NK1 Receptor Neurons are Regulated by Cholinergic Projections From the Basal Forebrain

Rhïannan H. Williams¹, Jacqueline Vazquez-DeRose¹, Alexia M. Thomas¹, Juliette Piquet^{2,3,4}, Bruno Cauli^{2,3,4} and Thomas S. Kilduff¹

¹Center for Neuroscience, Biosciences Division, SRI International, Menlo Park, CA 94025, USA, ²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, Paris, FR 75005, France, ³Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, UM 119, Neuroscience Paris Seine, Paris, FR 75005, France and ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Paris, FR 75005, France

Address correspondence to Dr Thomas S. Kilduff, Center for Neuroscience, Biosciences Division, SRI International, 333 Ravenswood Avenue, Menlo Park, CA 94025, USA. Email: thomas.kilduff@sri.com

Abstract

Cholinergic (ACh) basal forebrain (BF) neurons are active during wakefulness and rapid eye movement (REM) sleep and are involved in sleep homeostasis. We have previously shown in adult animals that cortical neurons that express neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and the receptor for Substance P (NK1R) are activated during non-REM (NREM) sleep in proportion to homeostatic sleep drive. Here, we show that BF neurons modulate cortical nNOS/NK1R cells. In vitro optogenetic stimulation of BF terminals both activated and inhibited nNOS/NK1R neurons. Pharmacological studies revealed cholinergic responses mediated by postsynaptic activation of muscarinic receptors (mAChRs; M3R > M2/4R > M1R) and that presynaptic M3R and M2R activation reduced glutamatergic input onto nNOS/NK1R neurons whereas nicotinic receptor (nAChR)-mediated responses of nNOS/NK1R neurons were mixed. Cholinergic responses of nNOS/NK1R neurons were largely unaffected by prolonged wakefulness. ACh release, including from BF cells, appears to largely excite cortical nNOS/NK1R cells while reducing glutamatergic inputs onto these neurons. We propose that cholinergic signaling onto cortical nNOS/NK1R neurons may contribute to the regulation of cortical activity across arousal states, but that this response is likely independent of the role of these neurons in sleep homeostasis.

Key words: acetylcholine, arousal, cortex, muscarinic, nicotinic, nitric oxide, sleep, wakefulness

Introduction

Sleep/wake and rest/activity cycles are thought to be homeostatically regulated processes throughout the animal kingdom. In mammals, slow wave activity (SWA; 0.5–4.0 Hz) recorded in the electroencephalogram (EEG) during nonrapid eye movement (NREM) sleep declines across a sleep period but increases as wakefulness is extended (Borbely 1982). EEG SWA is thus considered to be a neurophysiological index of homeostatic sleep pressure that reflects underlying neurochemical processes. The slow waves that comprise EEG SWA are thought to be generated by a corticothalamocortical loop involving

intrinsic cortical and thalamic oscillators (Steriade et al. 1993; Crunelli and Hughes 2010).

We have described a population of cortical neurons with elevated activation (c-FOS immediate early gene expression) preferentially during sleep in three mammalian species (Gerashchenko et al. 2008; Pasumarthi et al. 2010; Morairty et al. 2013; Dittrich et al. 2015). In these GABAergic cortical neurons, activation is proportional to time kept awake and increases in conjunction with elevated homeostatic sleep “drive.” This rare cortical neuron population can be identified in mouse brain by coexpression of neuronal nitric oxide

synthase (nNOS) and NK1R, the receptor for Substance P (Dittrich et al. 2012). These cells correspond to Type I nNOS neurons that are preferentially found in the deep layers of the cortex (Yan and Garey 1997; Smiley et al. 2000; Lee and Jeon 2005). Because cortical Type I nNOS cells are projection rather than local circuit interneurons (Tomioka et al. 2005; Higo et al. 2007; Tomioka and Rockland 2007; Higo et al. 2009), they have the capacity to have widespread influence on the cortex through a combination of GABAergic, peptidergic and nitrergic neurotransmission. Accordingly, we have proposed that cortical nNOS/NK1R neurons may be a previously unrecognized substrate for homeostatic sleep regulation (Kilduff et al. 2011).

Due to their scarcity, little information exists regarding the electrophysiological properties of cortical nNOS/NK1R neurons or their neurochemical regulation. Unsupervised cluster analysis on a sample of interneurons expressing nNOS mRNA identified a class of cells that likely corresponds to Type I nNOS neurons (Perrenoud et al. 2012). These putative Type I nNOS cells had large somata that coexpressed somatostatin (SOM) and Neuropeptide Y, displayed adapting discharges, fired long duration action potential spikes followed by fast afterhyperpolarization (fAHP), and had significantly slower membrane time constants than other interneurons. Such cortical nNOS neurons have been reported to receive both serotonergic and cholinergic inputs (Cauli et al. 2004; Dittrich et al. 2012).

Since cortical nNOS/NK1R neurons preferentially express c-FOS during sleep, we have hypothesized that these cells are functionally inhibited during wakefulness by the wake-active monoaminergic and cholinergic cell groups and that c-FOS expression occurs during sleep partly as a consequence of disfacilitation of wake-active cell groups (Kilduff et al. 2011). Among wake-active populations, the basal forebrain (BF) cholinergic neurons have been reported to project to cortical nNOS neurons in the rat (Vaucher et al. 1997) and electrical stimulation of the rat BF increases c-FOS bilaterally in nNOS neurons, suggesting an excitatory BF projection to these cells (Kocharyan et al. 2008). Since ACh responses are highly variable across cortical layers and among GABAergic interneurons (Kawaguchi 1997; Gullledge et al. 2007), how deep layer Type I cortical nNOS/NK1R neurons are affected is unclear. Here, we show that the nNOS/NK1R cells are predominantly activated by cholinergic afferents, including those from the BF, and that this response is age-independent. We also establish that c-FOS expression in cortical nNOS/NK1R cells is elevated with increased sleep pressure in juvenile, as well as adult, mice.

Materials and Methods

Animals

All rodents were maintained under 12 h light:12 h dark conditions at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 25\%$ relative humidity with food and water ad libitum and were treated in accordance with guidelines from the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. All protocols were approved by SRI International's Institutional Animal Care and Use Committee. C57Bl/6J mice were used for in vitro electrophysiological slice recordings (P14-23, male and female), anterograde tracer experiments (6-8 weeks old, male and female) and the sleep deprivation (SD) experiments (P19-21, male and female). Two strains were used for the optogenetic experiments: (1) > 10 week old male and female nNOS-CreER, Ai14 progeny, produced by crossing nNOS-CreER (B6;129S-Nos1^{cre-1(f/w)2673/2673}); Jackson Laboratories strain #014541) and Ai14 mice (B6;129S6-Gt (ROSA)26Sor^{tm32(CAG-CAG-COM7134R/eYFP)129}); Jackson Laboratories strain #007914), and (2) P21-24 male and female ChAT-IRES-Cre;Ai32 progeny, produced by crossing ChAT-IRES-Cre (B6;129S6-Chat^{ires-1(f/w)1024}); Jackson Laboratories strain #006410) and Ai32 mice (B6;129S6-Gt (ROSA)26Sor^{tm32(CAG-CAG-COM7134R/eYFP)129}); Jackson Laboratories strain #012569). Brains from ChRNA2-cre; R26^{tdTomato} mice, used exclusively for immunohistochemical studies, were obtained from Professor Klas Kullander, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

#007914), and (2) P21-24 male and female ChAT-IRES-Cre;Ai32 progeny, produced by crossing ChAT-IRES-Cre (B6;129S6-Chat^{ires-1(f/w)1024}); Jackson Laboratories strain #006410) and Ai32 mice (B6;129S6-Gt (ROSA)26Sor^{tm32(CAG-CAG-COM7134R/eYFP)129}); Jackson Laboratories strain #012569). Brains from ChRNA2-cre; R26^{tdTomato} mice, used exclusively for immunohistochemical studies, were obtained from Professor Klas Kullander, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

Stereotaxic Injections

Neuronal Tracing

We unilaterally microinjected 50 nL of 5% biotinylated-dextran amine (BDA; D-1956, Life Technologies) in sterile 0.5 M phosphate-buffered saline (PBS) into the BF region of male and female C57Bl/6J mice, targeting the magnocellular preoptic/substantia innominata (MCPO/SL, AP: 0.15 mm; ML: -1.2 mm; DV: -5.6 mm) (Franklin and Paxinos 2007). Injections occurred over 5 min, pausing an additional 15 min at the injection site before the microinjector was slowly removed to prevent transport up the injection tract. Two weeks later, mice were sacrificed, perfused with 4% paraformaldehyde (PFA), and brains taken for immunohistochemistry.

Expression of Channelrhodopsin in the Mouse BF

Using the same microinjection method and injection site coordinates as in the neuronal tracing experiments, we unilaterally microinjected 100 nL of an adeno-associated viral (AAV) vector that encoded channelrhodopsin (ChR2) into the BF of male and female nNOS-CreER, Ai14 mice. This AAV-ChR2(H134R)-eYFP virus (titer: 3.39×10^{13} genomic copies/mL; construct: AAV9-hSYN-hChR2(H134R)-eYFP-WPRE-hGH; from Dr. K. Deisseroth, Stanford University) (Jackman et al. 2014) was obtained from the Penn Vector Core (University of Pennsylvania). Three weeks after AAV injections, we injected tamoxifen (75 mg/kg, i.p.) to induce Cre expression in nNOS neurons. Mice were 4-6 months old when they were sacrificed for in vitro optogenetic studies, followed by immunohistochemistry to identify viral expression within the BF and ChR2-containing fibers in the cortical recording site.

Cortical Area of Interest

For all experiments, we principally targeted layer V-VI nNOS/NK1R cells at the border of the cingulum between motor cortex 1 and cingulate cortex 2 (Bregma: 0.74-0.26 mm) (Franklin and Paxinos 2007). This region of interest was chosen because it has a relatively dense expression of nNOS/NK1R neurons and was readily identified across slices in the multiple experimental preparations used.

Sleep Deprivation of Juvenile Mice

For experiments related to sleep homeostasis, the reference point used was lights-on or ZT (Zeitgeber Time) 0, when sleep pressure is high. To determine whether activation of nNOS/NK1R cells occurs during sleep in young mice as occurs in adult rodents (Gershchenko et al. 2008; Morsairty et al. 2013), cohorts of juvenile (P19-21) mice, separated from their parents, were assigned to one of the following experimental groups ($n = 3-4$ group): (1) 4 h SD, (2) 4 h SD followed by 90 min recovery sleep (RS), (3) undisturbed ("UndistB") ZT4 control, and (4) undisturbed ZT5.5 control. SD was initiated at lights on (ZT0; 6:00 am) and consisted of gentle handling and/or light cage tapping in the home cage to

keep mice awake for the 4 h duration. Undisturbed mice remained in their home cage and were untouched by the experimenter; mice in the RS group were undisturbed for 90 min after the 4 h SD period.

Immunohistochemistry and Cell Counting

Juvenile Mice

Mice were given a terminal injection of SomnaSol (Henry Schein) before being transcardially perfused with PBS and heparin followed by 4% PFA. After removal of the brain, the tissue was cryoprotected (30% sucrose, 0.1 M PB solution) and cut into six series of 30 μ m thick coronal sections. One series of six sections from each mouse was then processed in rabbit anti-c-FOS (1:8000, sc-52, Santa Cruz Biotechnology) and goat anti-nNOS (1:3000, ab1376, abcam). The secondary antibodies used were donkey anti-rabbit IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch) and Alexa Fluor 594 affiniPure donkey anti-goat IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch). C-FOS was detected with nickel-enhanced 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (nDAB; 10 min; SK4100, Vector Laboratories).

Tracing of BF Efferent Projections

One series of four sections from each mouse ($n = 3$) was then processed with nDAB (10 min; SK4100, Vector Laboratories) to detect the BDA before secondary detection using goat anti-nNOS (1:3000, ab1376, abcam), followed by donkey anti-goat IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (2 min; SK4100, Vector Laboratories).

nNOS-CreER;Ai14 Mice

For nNOS cell counts, two 4% PFA-fixed brains (male, 10-week age) were prepared for histological analysis as above. One series of three sections from each mouse was processed in rabbit anti-RFP (1:3000, Rockland) and goat anti-nNOS (1:3000, ab1376, abcam). The secondary antibodies used were Alexa Fluor 594 affiniPure donkey anti-rabbit IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch) and Alexa Fluor 488 affiniPure donkey anti-goat IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch). For confirmation of ChR2 transduction in BF-injected mice, sections (250 μ m) were postfixed following sacrifice for *in vitro* electrophysiology and coronal slices were resectioned (40 μ m thick). BF sections were processed in goat anti-ChAT (1:1000, AB144, EMD Millipore) and chicken anti-GFP (detects ChR2-eYFP, 1:500, 24 h; abcam), while cingulate cortex sections anterior to the BF were processed with goat anti-nNOS (1:3000, ab1376, abcam) and chicken anti-GFP. The secondary antibodies used were donkey anti-goat IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch) followed by streptavidin coumarin AMCA conjugate (1:500, 2 h; Jackson ImmunoResearch), and Alexa Fluor 488 affiniPure donkey anti-chicken IgG (for GFP; 1:500, 1 h; Jackson ImmunoResearch).

Chrna2-Cre; R26^{lacZ} Mice

Two 4% PFA-fixed brains, one female 3-week juvenile and one female 18-week adult (gift from Professor Kullander, Uppsala University) (Leao et al. 2012; Perry et al. 2015), were prepared for histological analysis as above. One series of six sections from each mouse was processed in rabbit anti-RFP (1:3000, Rockland) and goat anti-nNOS (1:3000, ab1376, abcam). The secondary antibodies used were Alexa Fluor 594 affiniPure donkey anti-rabbit IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch) and Alexa Fluor 488 affiniPure donkey anti-goat IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch).

Postrecording Verification of Cell Phenotype

To confirm that cells recorded from WT, nNOS-CreER;Ai14 and ChAT-Cre;Ai32 mice in the pharmacological and optogenetic experiments were layer V-VI nNOS/NK1R neurons, brain slices were postfixed in 4% PFA, resectioned, and processed for immunohistochemical markers as above. For neurobiotin staining, the secondary streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (1:250, 1 h; ThermoFisher Scientific) was used. For cells collected for scRT-PCR, slices were postfixed in 4% PFA before processing for biocytin and nNOS. Thick sections (250 μ m) were incubated overnight in goat anti-nNOS (1:1000, abcam) and then Alexa Fluor 594 affiniPure donkey anti-goat IgG (1:1000, 2 h; Jackson ImmunoResearch) with streptavidin-conjugated fluorescein (DTAF; for biocytin; 1:500, 2 h; Jackson ImmunoResearch). Sections were mounted using Pro-Long Diamond antifade mountant with DAPI (P36966, ThermoFisher Scientific) and images captured using A1 confocal laser microscope system (Nikon) and NIS-elements software (Nikon).

Cell Counts and Tracing

Excluding images from thick sections, all other images were taken on Leica CTR 5000 microscope and superimposed in Adobe Photoshop. The region counted matched the cortical area of interest. The number of nNOS neurons and the number of nNOS cells colocalizing with either c-FOS or RFP in Layer V-VI of the region of interest were counted in 4–6 hemispheres per mouse. The percentage of colocalized nNOS cells per mouse was calculated and the grouped data expressed as mean \pm SEM. Specificity of the RFP reporter for nNOS neurons was assessed by counting the number of neurons costained for RFP and nNOS as a percentage of the total RFP cell count. Transduction efficiency was calculated by counting the number of neurons costained for RFP and nNOS as a percentage of the total nNOS cell count.

Antibody Characterization

The specificity of the primary goat antineuronal nitric oxide antibody (nNOS, abcam) was tested by comparing colocalization with the previously characterized rabbit anti-nNOS (Invitrogen). There was 100% overlap between the antibodies. The specificity of the primary antibody for red fluorescent protein (RFP, Rockland) was indicated by the selective coexpression with nNOS in nNOS-CreER;Ai14 mice. All other primary antibodies were taken from the JCN antibody database ([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1096-9861/homepage/jcn_antibody_database.htm](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1096-9861/homepage/jcn_antibody_database.htm)). Specificity of all secondary antibodies was confirmed by omitting the primary antibodies and analyzing the brain tissue for immunoreactivity. None of the secondary antibodies used in negative primary controls demonstrated immunoreactivity above background levels.

In Vitro Electrophysiology

Coronal brain slices (250 μ m) were prepared in ice-cold, oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) sucrose-based artificial cerebral spinal fluid (aCSF) containing (in mM): 250 sucrose, 2.5 KCl, 1.24 NaH₂PO₄, 10 MgCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂ (305 mOsm/L). Slices were incubated in aCSF containing (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.24 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂ (300 mOsm/L) at 37°C for 15 min. Thereafter, slices were maintained and recorded at 22°C with a CSF flow rate of ~1 mL/min.

For voltage- and current-clamp recordings, the pipette solution contained (in mM): 130 K-gluconate, two KCl, three MgCl₂, two

MgATP, 0.2 Na₂GTP, 10 HEPES, 0.2 EGTA (290 mOsm/l, pH 7.3). To enable visualization of patched cells during recording, 0.1% Lucifer Yellow was included in the pipette solution as well as 0.01% neurobiotin (NB) to facilitate post hoc identification of patched cells. All recordings were acquired with a MultiClamp 700 A amplifier, Digidata 1322 A digitizer interface and pClamp nine software (Molecular Devices). Voltage-clamp data were sampled at 7 kHz and filtered at 3 kHz; current-clamp data were sampled at 20–25 kHz and filtered at 10 kHz. Changes in input resistance (R_{in}) were monitored across the experiments by injecting hyperpolarizing steps (–20 pA or –40 pA) periodically by switching from voltage-clamp mode and recording in current-clamp mode. Voltage-clamp recordings were then concatenated to remove breaks. Series resistance varied from 10–60 M Ω and was monitored during voltage-clamp recordings. Any neurons deviating >10% in series resistance over time were excluded from analysis; the bridge balance was maintained and monitored during current-clamp recordings. Membrane potential measurements were not corrected for the theoretical liquid junction potential of –15 mV between pipette solution and bath solution. The reference electrode was a Ag/AgCl[–] pellet.

Recordings of Cortical nNOS/NK1R Neurons From WT Mice

Layer V–VI nNOS/NK1R neurons were identified following a brief bath application of substance P-conjugated tetramethylrhodamine (SP-TMR, 50 nM), a fluorescent ligand for the NK1R receptor (Dittrich et al. 2012). Following a 20 min washout period, internalization of receptor-bound fluorescent ligand enabled visualization of nNOS/NK1R cells for patch-clamp recording.

Recordings of Cortical nNOS Neurons From nNOS-CreER;Ai14 Mice and Photostimulation of BF Afferents

Cortical nNOS neurons in adult nNOS-CreER;Ai14 mice were identified on the basis of their anatomical location and expression of the fluorescent tdTomato marker. For current-clamp recordings, nNOS neurons were recorded at their resting membrane potential (RMP) and any deviations in membrane potential (V_m) due to photostimulation were determined.

Photostimulation of Cholinergic Afferents onto Cortical nNOS/NK1R Neurons

For optogenetic experiments, the photostimulation protocol to activate Chr2 in BF terminals was a 5 ms pulse at 1 Hz. Chr2-expressing BF neurons, axons, and terminals were activated by full-field 470 nm light pulses via a blue-light-emitting diode (Lumencor Spectra light engine, Lumencor). This light source was coupled to the epifluorescence light path of an upright Leica DM LFSA microscope (Leica Microsystems, Germany). When light was applied through a 40x objective, a 1 mm wide beam with ~10 mW/mm² power density was produced that had minimal tissue heating effects as we previously reported (Williams et al. 2014). Photostimulation was repeated in the presence of glutamatergic (CNQX, 7 μ M; AP-5 100 μ M) and GABAergic (2-HS, 5 μ M; BIC, 10 μ M) blockers. Application of glutamate blockers alone removed all sEPSC activity; muscarinic antagonist (atropine, AT, 5 μ M) was then tested in nNOS cells that responded to photostimulation. Temporal fidelity was calculated as the percentage of light-evoked EPSCs (oEPSCs; V_h was –60 mV) concordant with blue-light application. Due to variability in baseline membrane potential and action potential threshold, cells were injected with current to hold the baseline

value around –61 mV between cells for pharmacological applications in current-clamp recordings.

Recordings of Cholinergic BF Neurons From ChAT-IRES-Cre;Ai32 Mice

Cholinergic neurons of the BF (MCPO/Sl) were identified by eYFP fluorescence. Both voltage-clamp and current-clamp protocols were used to assess the temporal fidelity of Chr2 expression by applying 0.25–100 Hz pulse trains (5 ms pulse width; 20 s photostimulation period every 40 s, repeated for three trials) from a blue-light-emitting diode (470 nm light, Lumencor Spectra Light Engine). These data provide an insight into the efficiency of optogenetic stimulation of cholinergic cell bodies and thus the ability to drive terminal ACh release in the cortex (Fig. S1D).

Recording From nNOS/NK1R Cells in Juvenile Mice Subjected to Sleep Deprivation

To determine whether prolonged wakefulness affected the response of cortical nNOS/NK1R neurons to carbachol (CCh) application (see Results), juvenile mice (male and female, P14–23) were sleep deprived from ZT0 for 4 h as described above before being sacrificed for *in vitro* electrophysiology.

Electrophysiological Properties of nNOS/NK1R Cells

To study the basic electrophysiological properties of nNOS/NK1R neurons labeled with SP-TMR or tdTomato, we recorded a 2 s baseline before injecting a hyperpolarizing pulse (1 s, –40 pA increments) to assess the presence of a hyperpolarization-activated cation current (I_h), and rebound depolarization. These were calculated by measuring the deviations in V_m toward the end of current injection relative to the start of current injection (I_h) or the rebound V_m level 70 ms after the end of current injection relative to baseline. Spike ratio was calculated by counting the number of spikes in the 500 ms before injection of a –80 pA hyperpolarizing pulse divided by the number of spikes within the first 500 ms after the end of the pulse. In addition, depolarizing pulses (1 s, +40 pA increments) were used to assess spike frequency, the V_m for first spiking activity, and afterhyperpolarization (AHP). AHP was measured on a single spike per cell at the V_m for first spiking activity. AHP calculated was the medium AHP (mAHP), measured as the initial deflection (within –20 ms of spike termination) past baseline V_m relative to the action potential firing threshold (Lape and Nistri 2000; Matthews et al. 2009). Since SOM-containing neurons are known to have a fast AHP (fAHP) and concomitant afterdepolarization (ADP) (Karagiannis et al. 2009), these parameters were also measured if present.

Cytoplasm Harvest and Single-Cell Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction

At the end of whole-cell recordings that lasted less than 20 min, the cytoplasmic content was aspirated into the recording pipette. The content of the pipette was expelled into a test tube and RT was performed in a final volume of 10 μ l as described previously (Lambold et al. 1992). The single-cell reverse transcription/polymerase chain reaction (scRT-PCR) protocol was designed to probe simultaneously for the expression of acetylcholine receptor mRNAs and mRNAs encoding well-established markers of cortical Type I NOS interneurons (Ascoli et al. 2008; Karagiannis et al. 2009; Dittrich et al. 2012). Acetylcholine receptors assessed included the alpha and beta

Table 1. PCR primers used to amplify GABA interneuron markers and cholinergic receptor mRNAs

Genes accession #	First PCR primers	Size (bp)	Second PCR nested primers	Size (bp)
GAD65 NM_008078	Sense, 99: CCAAAA GTTCACGGGCGG Antisense, 454: TOCTCCAGATTTTGGGGTTG Cabezas et al. (2013)	375	Sense, 219: CACCTGGACCAAAAACCOCT Cabezas et al. (2013) Antisense, 447: GATTTTGGGGTTGGTCTGCG Cabezas et al. (2013)	248
GAD67 NM_008077	Sense, 529: TAGGGGTTCCGACAGGTC Cabezas et al. (2013) Antisense, 1109: CCCAGGACGATCCACAT Cabezas et al. (2013)	598	Sense, 801: CCCAGAA GTGAAGACAAAAGGC Cabezas et al. (2013) Antisense, 1034: AATGCTCCGTAAACAGTCTGTC Cabezas et al. (2013)	255
SOM NM_009215	Sense, 43: ATCGTCTGGCTTTGGGC Cauli et al. (1997) Antisense, 231: GCCTCATCTGCTGCTGCTCA Cauli et al. (1997)	208	Sense, 75: GCCCTGGACCCCGACT Gallopin et al. (2006) Antisense, 203: GCAAACTCTCGGGCTCCA	146
NPY NM_023456	Sense, 16: CGAATGGGGCTGTGTGGA Cabezas et al. (2013) Antisense, 286: AAGTTTCATTTCCGATCACCACAT Cabezas et al. (2013)	294	Sense, 38: CCCTGGCTCTATCTCTGCTGCT Cabezas et al. (2013) Antisense, 236: GGGTTTCTGTGCTTCTCTCA Cabezas et al. (2013)	220
nNOS NM_008712	Sense, 3009: GCAAAGTCTAAATCCAGCCGA Antisense, 3403: TGCCCAATTTCCATTCCTCATA	416	Sense, 3034: ACCATCTTCGTGCTCTCCA Antisense, 3346: GCTTCTCTTCTCATGTTGTCGC	334
NK1R NM_009313	Sense, 30: TCTCTTCCCAACACCTCCA Antisense, 459: GGAGAGCCAGGCCAGATG	449	Sense, 123: CATCGTGGTACTTCCGTGG Antisense, 397: TGAAGAGGTTGATGATGGC	294
SOM intron XS1468	Sense, 8: CTGTCCCCCTTACGAATCCC Cabezas et al. (2013) Antisense, 228: CCAAGCACCAGGATAGAGCC Cabezas et al. (2013)	240	Sense, 16: CTTACGAATCCCCAGCCCTT Cabezas et al. (2013) Antisense, 178: TTGAAAGCCAGGAGGA ACT Cabezas et al. (2013)	182
nAChR2 NM_144803	Sense, 1153: ATGGATGCTGAAGAAAGGGAGG Antisense, 1502: GAACGGAGGGAGGAAGAGCC	369	Sense, 1177: ACAGAGGAAGAGGAGGAGGAGG Antisense, 1459: CGATAATGAACAGCCAGAGGAA	304
nAChR3 NM_145129	Sense, 49: ATGCTGATGCTGGTCTGCTGAT Antisense, 480: AAACGGGAAGTAGGTCA CATCG	453	Sense, 162: CGTGTCCATCTCTGTCATCA Antisense, 361: TCGGCGTTGTTGTAAGCAC	219
nAChR4 NM_015730	Sense, 139: TTCTCTGGCTACAACAA GTGGTCT Antisense, 406: TTTGGTTA GGTGGTGA CTGTC	288	Sense, 182: CAGATGTGGTCTTGTCCGC Antisense, 336: GTTCAGATGGGATGCGGATG	174
nAChR5 NM_176844	Sense, 205: TGGTTGAAAGCAAGGAATGGATAG Antisense, 552: GATTTCCCATTTCCATTTGTCA	369	Sense, 205: TGGTTGAAAGCAGGAATGGATAG Antisense, 392: TGTAGTTTGTGGTGGCTCC	208
nAChR6 NM_021369	Sense, 36: CGGTTTATGTCTGTGGCTATGTG Antisense, 481: CAAAAGGGAGGAAGGTGATGTC	467	Sense, 127: GCTCACTACAAACCGCTCATCC Antisense, 337: TGTCAAGCTTCCAGATGTTGTC	232
nAChR7 NM_007390	Sense, 353: CAGATGAACGCTTTGA TGCC Antisense, 740: GCAAGAAATACAGCAAGCCCA	408	Sense, 409: CATTGCCAGTA TCTCCCTCCA Antisense, 707: GCAACAAGGAATGAGCAGGT	319
nAChRb2 NM_009602	Sense, 56: TGTGTTTCCAGGGTTTTGGGTA Antisense, 480: GCTGTGCAAAATGGGAAATGTC	444	Sense, 210: GCACGAGCCGGAGCAGAT Antisense, 480: GCTGGTCAAAATGGGAAATGTC	290
nAChRb3 NM_173212	Sense, 105: AGACGGCACTCTCAGACATTTG Antisense, 635: GTTGCCCTTTCATCCCTTTG	550	Sense, 140: AGAAATGTGTCGCCCTGTG Antisense, 600: TCCCACTCTCGTTATCAAAAAAG	484
nAChRb4 NM_148944	Sense, 13: CCCTGCTCCTGCTCTCTCT Antisense, 349: GTCCATCGGCATTTGTGTA	356	Sense, 13: CCCTGCTCCTGCTCTCTCT Antisense, 318: CAGGCAACCAGACTCGCTTT	325
mAChR1 NM_001112697	Sense, 818: GCTGGAAGAAGAAAGGAAAGAGG Antisense, 1281: CAACAGCAGGCGGAAAGTG	482	Sense, 927: TGAGGCA CAGGCCCA Antisense, 1204: GTAGCAAAGCCAGTAGCCCA	298
mAChR2 NM_203491	Sense, 800: GGGACGGTGGGACTGAAAAC Antisense, 1095: GGCTGCTGTGTCATCTTCA	316	Sense, 825: TCAGGGGAGGAGAAAGAAAG Antisense, 1054: TTCTGCTTTTCAACCATTTCTG	252
mAChR3 NM_033269	Sense, 811: GGGACAGAAGCGGAAGCAGA Antisense, 1121: TTGGTAGA GTTGAGGATGGTGC	332	Sense, 838: GTCCACCCACAGGCA GTTC Antisense, 1010: GGCAGCAGCATCGTTGTTAT	192
mAChR4 NM_007699	Sense, 897: TGCCACCCAGAA CACCA Antisense, 1308: TAGCAAGCCAGTAGCCGATG	432	Sense, 984: GCAGCCAGCAACCCCTCAA Antisense, 1230: TTGTAGGGTGTCCAGGTGAGG	267
mAChR5 NM_205783	Sense, 705: TGTGGCAG AAGTCAAGAAGAGAAA Antisense, 1044: TAGTCATGTTTTCAGTCCGAGGG	363	Sense, 807: CTCTGGTCACTCTCCCGTA Antisense, 1010: TTTCTTGGTCTCTTGGGTATTGA	227

Note: Position 1, first base of the start codon.

nicotinic receptor (nAChR) subunits nAChR2, nAChR3, nAChR4, nAChR5, nAChR6, nAChR7, nAChRb2, nAChRb3, and nAChRb4 and the muscarinic receptor (mAChR) subtypes mAChR1, mAChR2, mAChR3, mAChR4, and mAChR5. Neuronal markers included the two isoforms of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65 and GAD67), Somatostatin (SOM), Neuropeptide Y (NPY), the neuronal isoform of Nitric Oxide

Synthase (nNOS), and the substance P receptor (NK1R). The SOM intron (SOM int) was also included as an indicator of the presence of genomic DNA that can occur when the nucleus is harvested (Hill et al. 2007). A two-step amplification was performed essentially as described (Cauli et al. 1997; Cabezas et al. 2013) using the primer pairs listed in Table 1. All primer pairs were designed to span introns except those for mAChR1, mAChR2, mAChR3,

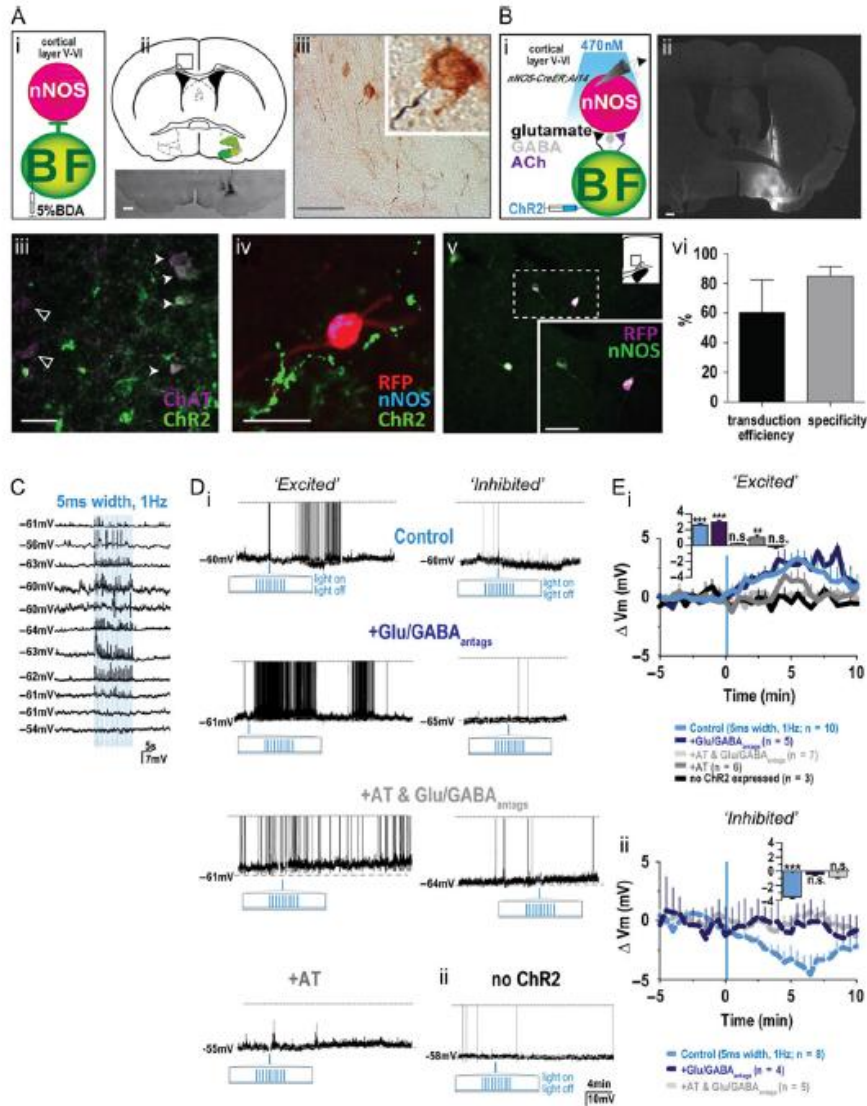


Figure 1. Identification of a BF cholinergic projection to cortical nNOS neurons in mice. (A) (i) schematic of the tracer experiments in which (ii) 5% BDA (lower panel, black) was injected into the BF [scale bar = 250 μ m] and revealed (iii) a BDA-labeled BF fiber projection (black) in close proximity to a cortical nNOS α II visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride [brown, scale bar = 25 μ m]. (B) (i) Schematic of the experimental design in which RFP-labeled cortical nNOS neurons from nNOS-CreER;Ai14 mice are recorded in vitro while Chr2-eYFP-containing terminals projecting from the BF are illuminated. (ii) Coronal section demonstrating BF injection of Chr2-eYFP to target neurons of the MCPO/S1 [scale bar = 250 μ m]. (iii) Colocalization (white arrowheads) between eYFP-labeled Chr2-eYFP (green) and cholinergic ChAT-labeled neurons (magenta) in the BF indicates that some ChAT cells express Chr2. Single-labeled ChAT cells (magenta) are denoted by clear arrowheads [scale bar = 25 μ m]. (iv) Confirmation that cortical cells in nNOS-CreER; Ai14 mice that coexpress red fluorescent protein (RFP) and nNOS are in close proximity to Chr2-eYFP fibers from the BF [scale bar = 25 μ m]. (v) Colocalization between RFP neurons (magenta) and nNOS-labeled neurons (green) in the cingulate cortex of nNOS-CreER; Ai14 mice [scale bar = 25 μ m]. (vi) Transduction efficiency and specificity of RFP to nNOS neurons within the cingulate cortex. (C) Current-clamp responses of cortical nNOS-RFP cells to repeated blue-light (470nm) stimulation (5 ms pulse width, 1Hz). (D) To isolate putative acetylcholine release caused by light-evoked terminal stimulation, we applied either glutamatergic ('Glu': CNQX, 7 μ M, AP-5, 100 μ M) and GABAergic ('GABA': 2-HS, 5 μ M,

mAChR4, mAChR5 and the SOM intron. A 10 μ L of each individual PCR product were run on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide using Φ X174 digested by HaeIII as a molecular weight marker. The RT-PCR protocol was tested on 1 ng of total RNA purified from mouse whole brain. All amplicons detected were the sizes predicted from published sequences (Table 1). In 13 cells analyzed, six contained a positive result for the SOM intron and were excluded from the mAChR dataset to avoid false positives.

Chemicals

4-DAMP (M1/3R antagonist, 10 μ M), VU025535 (VU; M1R antagonist, 5 μ M), PD102807 (PD; M4R antagonist, 500 nM), bicuculline methiodide (BIC; GABA_AR antagonist, 10 μ M), 2-hydroxysaclofen (2-HS; GABA_BR antagonist, 5 μ M), DL-AP-5 (AP-5; NMDA-R antagonist, 100 μ M), and CNQX disodium salt (CNQX; AMPA/KAR receptor antagonist, 7 μ M) were from Tocris. Tetrodotoxin (TTX; 1 μ M) and AP-5-DX116 (AP-5-DX; 2 μ M) were from abcam. Neurobiotin was from Vector Laboratories. All other chemicals were from Sigma-Aldrich.

Data Analyses and Statistics

We analyzed patch-clamp recording data using Clampfit 9 (Molecular Devices) and synaptic events using MiniAnalysis (Synaptosoft). The nonparametric Kolmogorov-Smirnov test (K-S test; MiniAnalysis) was used to quantify the effects of pharmacological treatments on sEPSC and mEPSC frequency for each cell; a neuron was defined as responsive to intervention if $P < 0.05$. Sample traces were generated with Igor Pro v6 (WaveMetrics) and graphs with Prism 5 (GraphPad). Neurons that demonstrated a high firing rate that obscured V_m measurements were analyzed with MiniAnalysis (Synaptosoft) to find baseline V_m . For other cells, V_m was taken in 30 s bins for a minimum period of 4 min prior to intervention. These data were then used to calculate the average baseline V_m or RMP. The effects of interventions on V_m were compared to this average baseline and the delta calculated. A dose-response curve to CCh was calculated as a percentage of the maximal response of the inward current to 5, 50, and 100 μ M CCh bath application (in TTX 1 μ M) and transformed into a log scale and fit with a nonlinear Boltzmann sigmoidal curve in Prism 5 (GraphPad). For voltage-clamp analyses, cells were included if the peak current was greater than the mean \pm 2 SD of the preceding baseline value. The baseline for all cells tested was -0.9 ± 0.4 pA (mean \pm SD). Unless otherwise stated, data are presented as mean \pm SEM with n = number of cells per group (represented in parenthesis for figures). We compared group means from the same cells using paired t-tests or one-way ANOVA followed by Bonferroni or Dunnett's post hoc tests; changes over time were analyzed by repeated measures (RM)-ANOVA or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test; different groups of cells were then compared using unpaired t-tests. A statistical significance threshold of $P < 0.05$ was used.

Results

The BF Projects to Contralateral Cortical nNOS/NK1R Cells in the Mouse

Previous studies in rat showed that cholinergic BF neurons project to cortical NOS-containing cells (Vaucher et al. 1997) and that electrical stimulation of the BF evokes c-FOS bilaterally in NOS cells (Kocharyan et al. 2008). We examined whether a BF projection was also present in C57/BL6 mice by injecting the anterograde tracer BDA into the BF region, targeting the magnocellular preoptic/substantia innominata (MCPO/SI) region (Fig. 1Ai-ii). To avoid contamination from the injection tract, we assessed innervation of the cortex contralateral to the injection site, with particular focus on the deep layers where Type I cortical nNOS/NK1R cells are principally located. BDA-stained fibers impinged on nNOS-immunoreactive cell bodies and dendritic fields within the cortical region of interest, suggesting direct innervation of cortical nNOS neurons by the BF (Fig. 1Aii). These observations are consistent with recent data demonstrating chemogenetic tracing of cholinergic BF neurons to the cingulate cortex (Anad et al. 2015; Chen et al. 2016).

Stimulation of BF Terminals Excites Cortical nNOS/NK1R Neurons

To evaluate the functionality of the putative cholinergic BF projection suggested in Figure 1Aii, we injected AAV9-hSYN-hChR2(H134R)-eYFP-WPRE-hGH into the MCPO/SI region of nNOS-CreER:Ai14 mice (Fig. 1Bi-ii) followed by tamoxifen injection (75 mg/kg, i.p.) three weeks later. We confirmed ChR2 expression in cholinergic neurons (Fig. 1Bii) and BF innervation of the cortex (Fig. 1Bii). The specificity of RFP reporter expression in nNOS neurons in nNOS-CreER:Ai14 mice (Fig. 1Bii) was $85 \pm 6\%$ in the cingulate cortex with a transduction efficiency of $60 \pm 22\%$ (Fig. 1Bii; $n = 2$ mice). Within the deep layers where nNOS cells were recorded, the specificity and transduction efficiency were $91 \pm 5\%$ and $63 \pm 21\%$, respectively.

In nNOS-CreER:Ai14 mice, we optogenetically stimulated the ChR2-expressing BF terminals on cortical nNOS/NK1R neurons contralateral to the BF injection site (Fig. 1C). Blue-light stimulation (5 ms pulse width at 1 Hz) evoked immediately observable membrane deflections and/or action potentials in some nNOS/NK1R neurons ($n = 11$ of 28, Fig. 1C). A proportion of cells demonstrated a delayed response to optical stimulation (>3 min; $n = 18$ of 28, 64%; Fig. 1D). Since ChR2 expression from the BF may include glutamatergic and GABAergic cells (Gritti et al. 2003; Hur and Zaborszky 2005; Henny and Jones 2008; Brown and McKenna 2015) as well as cholinergic BF cells, the nNOS/NK1R neurons that responded to illumination were analyzed further.

To isolate the contribution of putative cholinergic BF ChR2 terminals, we repeated the stimulation paradigm in the presence of blockers for glutamate (CNQX, 7 μ M and AP-5, 100 μ M) and GABA receptors (2-HS, 5 μ M; BIC, 10 μ M), the mAChR antagonist atropine (AT; 5 μ M), or both (Fig. 1D). Under control conditions, blue-light stimulation (5 ms pulse width, 1 Hz) evoked

BIC, 10 μ M) blockers, or the mAChR antagonist atropine (AT, 5 μ M), or all compounds before blue-light illumination. (f) Examples of current-clamp responses of cortical nNOS cells either excited or inhibited by blue-light stimulation of BF afferents (5 ms pulse width, 1 Hz). Dotted line indicates truncation of action potentials at -20 mV. (g) When light stimulation was applied to cortical nNOS/NK1R cells from mice not expressing ChR2, no effect was seen. (E) The change in V_m of nNOS-BFP neurons with blue-light illumination in the absence (control) and presence of blockers. Data were separated into cells showing either an overall depolarization (f) or hyperpolarization (g) response. Blue vertical bars in C, D, and E indicate photostimulation. BFP, red fluorescent protein (** $P < 0.001$; * $P < 0.01$; $\dagger P < 0.05$; n.s., nonsignificant; one-way ANOVA).

either significant membrane depolarization (2.63 ± 0.14 mV, $n = 10$, one-way ANOVA, $P < 0.001$; change in V_m averaged between peak response at 4–6 min vs. baseline $V_m = -0.09 \pm 0.04$ mV; Fig. 1Ei) or hyperpolarization (-3.60 ± 0.20 mV, $n = 8$, one-way ANOVA, $P < 0.001$; change in V_m averaged between peak response at 4–6 min vs. baseline $V_m = 0.1 \pm 0.20$ mV; Fig. 1Eii) in cortical nNOS neurons. When stimulation was repeated in the presence of glutamate/GABA blockers, the depolarization response was comparable (3.01 ± 0.19 mV, $n = 5$, one-way ANOVA, $P < 0.001$) while the inhibitory response was largely blocked (-0.41 ± 0.16 mV, $n = 4$, one-way ANOVA, $P < 0.001$). When repeated in the presence of AT and glutamate/GABA blockers, no significant change in V_m occurred in cells either previously depolarized or hyperpolarized by light stimulation (0.22 ± 0.03 mV, $n = 7$, one-way ANOVA, $P > 0.05$; change in V_m averaged between 4–6 min; and -0.75 ± 0.25 mV, $n = 5$; one-way ANOVA, $P > 0.05$). These results suggest that the light-evoked inhibitory responses are largely glutamatergic/GABAergic in origin while depolarization responses contain an AT-sensitive component. The latter conclusion is supported by data showing that cells that were significantly depolarized by light stimulation had reduced responses in the presence of AT alone (1.04 ± 0.29 mV, $n = 6$; one-way ANOVA, $P < 0.01$; change in V_m averaged between 4.5 and 6.5 min compared to baseline). We also observed changes in current and firing frequency to blue-light stimulation that were also differentially sensitive to AT, glutamate and GABA antagonists (Fig. S1). There were no changes in firing rate or membrane deflections recorded in response to photostimulation in brain slices taken from mice that were not injected with ChR2 ($V_m = -0.17 \pm 0.15$ mV, $n = 3$; Fig. 1Di and Ei).

Together, these data suggest that cortical nNOS neurons receive BF innervation, that photostimulation of these afferents can excite or inhibit nNOS neurons, and that a proportion of this innervation may be cholinergic.

Electrical Characteristics of Cortical nNOS/NK1R Neurons Identified by SP-TMR

Type I nNOS cells within the cortex express multiple neurotransmitter markers (Tricoire and Vitalis 2012) that have previously been used to identify subsets of cortical interneurons based on their electrophysiological characteristics (Kawaguchi and Kubota 1996; Ascoli et al. 2008). Based on several attributes of nNOS-expressing neurons described in the mouse barrel cortex, the sleep-active nNOS neurons have been suggested to correspond to the Adapt-SOM class of neurons (Perrenoud et al. 2012). To clarify their identity, we determined the electrical properties of the nNOS neurons in juvenile (P14–23) mice rather than adult brains because of impaired visualization of nNOS cells due to autofluorescence in slices from adult brains.

In juvenile male and female C57Bl/6J mice, nNOS/NK1R neurons were identified *in vitro* by application of the NK1R ligand SP-TMR and confirmed by postrecording immunohistochemistry (Fig. 2A). The nNOS/NK1R neurons recorded in the cortical region of interest were randomly sampled for electrophysiological characterization (Fig. 2B) as summarized in Table 2. A proportion of the nNOS/NK1R neurons analyzed were found to exhibit characteristics previously attributed to SOM-containing neurons and Type I nNOS neurons (Faselow et al. 2008; Perrenoud et al. 2012), namely, fAHP (-7.70 ± 0.73 mV, $n = 7$ of 30), mAHP (-10.83 ± 0.42 mV, $n = 30$), and ADP (2.30 ± 0.61 mV, $n = 7$ of 30). In adult male nNOS-CreER;Ai14 mice examined by optogenetic stimulation of BF terminals, nNOS/NK1R neurons exhibited electrical

characteristics similar to those of juvenile C57Bl/6J mice (P14–23; Fig. 2B,C), and did not differ significantly in any parameter tested (one-way ANOVA, $P > 0.05$).

Carbachol Evokes Diverse Responses in nNOS/NK1R Neurons

To determine which cholinergic mechanisms were involved in the response of nNOS/NK1R neurons to optogenetic stimulation of BF terminals, we bath applied the cholinomimetic carbachol (CCh; $50 \mu\text{M}$) and recorded from SP-TMR-identified nNOS/NK1R cells in coronal mouse brain sections (P14–23). The responses to CCh were predominately biphasic in both voltage-clamp and current-clamp (Fig. 3A). In voltage-clamp, there was often a brief outward current (4.89 ± 0.56 pA, $n = 12$; one-way ANOVA, $P < 0.05$) followed by a much larger inward current (-16.51 ± 2.48 pA, $n = 16$; one-way ANOVA, $P < 0.0001$; compared to baseline -0.6 ± 0.59 pA). These current changes corresponded with V_m hyperpolarization (-2.24 ± 0.57 mV, $n = 6$; one-way ANOVA, $P < 0.0001$) and depolarization (9.19 ± 1.86 mV, $n = 8$; one-way ANOVA, $P < 0.0001$), respectively. A range of CCh concentrations (5, 50, and $100 \mu\text{M}$) was tested and the half-maximal current response, based on the inward current response (+TTX), was determined to be $55 \mu\text{M}$ (Fig. 3B; $R^2 = 0.91$; $n = 5$); hence, $50 \mu\text{M}$ was used in subsequent studies.

Upon further examination, V_m and current changes showed oscillatory-type activity (Fig. 3C), suggesting competing inhibitory and excitatory drives. Since multiple cell types in the cortex might respond to CCh application and indirectly alter nNOS/NK1R neuron activity, we repeated the experiments in the presence of the Na^+ -channel blocker TTX ($1 \mu\text{M}$) to prevent postsynaptic effects from action potential-evoked release of other neurotransmitters. In the presence of TTX, the predominant response was an inward current in 71% of nNOS/NK1R cells (-16.18 ± 3.21 pA; $n = 39$; one-way ANOVA, $P < 0.0001$; Fig. 3D; compared to baseline -1.34 ± 0.46 pA); the remaining 29% of nNOS/NK1R neurons exhibited an outward current (7.91 ± 2.09 pA; $n = 16$; one-way ANOVA, $P < 0.01$; Fig. 3E). Concordant with the effect of CCh in voltage-clamp (Fig. 3F), current-clamp recordings in TTX indicated that 73% of nNOS/NK1R cells were excited by CCh (V_m depolarization of 6.62 ± 1.46 mV, $n = 29$; one-way ANOVA, $P < 0.0001$). The remaining 27% of cells were inhibited by CCh (-2.44 ± 0.43 mV; $n = 11$; one-way ANOVA, $P < 0.0001$; Fig. 3G). Lastly, to confirm a postsynaptic response, we repeated CCh application in the presence of TTX, blockers for both glutamate (CNQX, $7 \mu\text{M}$ and AP-5, $100 \mu\text{M}$) and GABA (BIC, $10 \mu\text{M}$ and 2-HS, $5 \mu\text{M}$), and $0 \text{ Ca}^{2+}/3.3 \text{ Mg}^{2+}$ -containing aCSF (Fig. 3H). Under these conditions, inhibitory responses evoked were $+5.05 \pm 2.18$ pA ($n = 2$ of 11) and -1.49 mV ($n = 1$ of 5); excitatory responses were -10.03 ± 1.35 pA ($n = 9$ of 11) and $+3.05 \pm 0.26$ mV ($n = 4$ of 5). Thus, the responses evoked by CCh were comparable to those in the presence of TTX alone (Fig. 3 vs. 3F and 3G).

Cholinergic Effects on Cortical nNOS/NK1R Cells are Partly Mediated by Postsynaptic Muscarinic Receptors

As indicated above, CCh has multiple effects on nNOS/NK1R neuron excitability. Since CCh can bind both nAChRs and mAChRs, we examined which receptors mediated the direct responses by applying CCh in the presence of mAChR antagonists and TTX. Due to the absence of reagents to distinguish between the M3R and the M5R (Eglen and Nahorski 2000; Wess 2004), we did not test for the presence of M5R.

First, to confirm the presence of postsynaptic mAChRs on cortical nNOS/NK1R neurons, we bath applied muscarine

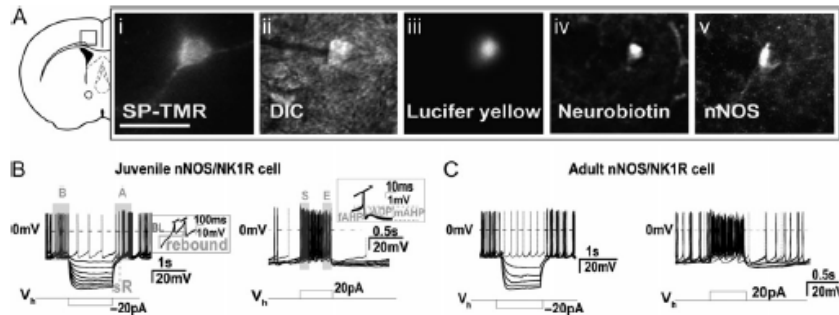


Figure 2. (A) Schematic illustration of the cortical region studied. Identification of cortical nNOS/NK1R cells following internalization of SP-TMR under (i) fluorescent and (ii) DIC illumination. Inclusion of (iii) Lucifer yellow (shown here a fiber pipette withdrawal) and (iv) Neurobiotin within the intracellular solution allowed visualization of the patched cell during recording and after postimmunohistochemical processing. (v) Confirmation that a patched cell was a Type I nNOS/NK1R neuron [scale bar = 25 μ m]. (B) Response of SP-TMR-identified cortical nNOS/NK1R neurons to hyperpolarizing (left) and depolarizing (right) current injections in slices from juvenile mice. Electrophysiological characteristics measured included afterhyperpolarization (fast and medium, fAHP and mAHP, respectively) and afterdepolarization (ADP; right panel inset). Spike ratio (sR) was quantified as the ratio B/A indicated by the shaded areas in the hyperpolarizing current injection trace; spike adaptation was quantified as the sE ratio denoted by the shaded areas in depolarizing current injection trace. (C) Example of an nNOS/NK1R cell recorded from an adult mouse brain slice showing electrophysiological properties comparable to those of juvenile mice illustrated in B.

Table 2. Electrophysiological characteristics of cortical nNOS/NK1R neurons

Property		
Rebound depolarization (sR)	-2.86 ± 0.83 mV	(n = 31)
Resting membrane potential (RMP)	-47.71 ± 1.63 mV	(n = 36)
Percent of quiescent cells at RMP	42%	(n = 13 of 31)
Firing frequency at RMP	4.16 ± 0.52 Hz	(n = 19)
Action potential threshold	-44.86 ± 0.84 mV	(n = 26)
I_h magnitude	2.46 ± 0.59 mV	(n = 31)
Spike ratio	1.26 ± 0.23	(n = 16)
Response to current injection (+80 pA)	5.80 ± 0.57 Hz	(n = 28)
mAHP	-10.83 ± 0.42 mV	(n = 30)
fAHP	-7.70 ± 0.73 mV	(n = 7 of 30)
ADP	-2.30 ± 0.61 mV	(n = 7 of 30)
Input resistance	601.7 ± 35.30 M Ω	(n = 36)
Cell capacitance	66.61 ± 4.25 pF	(n = 33)

(10 μ M; nonselective mAChR agonist) in the presence of TTX (1 μ M). Both inhibitory (outward I: 4.92 ± 0.99 pA; n = 5; $P < 0.01$; hyperpolarization: -2.44 ± 0.52 mV; n = 4; $P < 0.01$) and excitatory (inward I: -4.65 ± 2.36 pA; n = 3; $P < 0.05$; depolarization: 3.08 ± 0.87 mV; n = 4; $P < 0.001$) responses were recorded from nNOS/NK1R neurons (Fig. 4A). Second, we confirmed that no significant desensitization in the CCh-mediated response occurred after repeated applications of CCh (Fig. 4B).

To evaluate the possible involvement of postsynaptic mAChRs, we bath applied CCh in the presence of the nonselective mAChR antagonist atropine (AT; 1, 5, and 50 μ M). Fig. 4C,D illustrates that AT reduced the CCh-mediated currents to varying degrees at each AT concentration tested (outward I: one-way ANOVA, $P < 0.0001$; inward I: one-way ANOVA, $P < 0.0001$). AT 5 μ M (AT₅) consistently reduced CCh-evoked responses (before TTX: 3.00 ± 0.47 pA, n = 7 vs. with AT₅: -2.22 ± 1.01 pA, n = 3, $P < 0.001$; before TTX: -7.24 ± 1.16 pA, n = 18 vs. with AT₅: -0.93 ± 1.05 pA, n = 4, $P < 0.05$). CCh-evoked changes in membrane potential were reduced across all AT concentrations used (hyperpolarization: one-way ANOVA, $P < 0.01$; depolarization:

one-way ANOVA, $P < 0.01$), although hyperpolarization was significantly reduced only in 5 μ M and 50 μ M AT (before TTX: -2.94 ± 0.71 mV, n = 6 vs. with AT₅: 0.78 ± 0.74 mV, n = 2 or with AT₅₀: 0.73 ± 0.75 mV, n = 4, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) and depolarizations in AT₅₀ (before TTX: 4.10 ± 1.13 mV, n = 11 vs. with AT₅₀: 0.21 ± 0.39 mV, n = 8, $P < 0.01$). Although off target effects are possible at the AT₅₀ concentration, the CCh-evoked responses were sensitive to the lower concentrations of AT and thus support a role for mAChRs on cortical nNOS/NK1R cells.

To address mAChR-mediated excitatory effects of CCh on nNOS/NK1R cells, we utilized antagonists for the G_q-coupled M1R and M3R (Fig. 4E-H). Application of the M1R antagonist VU025535 (5 μ M) did not significantly affect the inward current compared to baseline (CCh alone: -8.45 ± 1.45 pA vs. CCh and VU: -10.48 ± 2.18 pA, n = 4; one-way ANOVA, $P > 0.05$) or reduce the CCh-mediated postsynaptic V_m depolarization (CCh alone: 18.66 ± 7.65 mV vs. CCh and VU: 6.37 ± 3.73 mV, n = 4; paired t-test, $P = 0.09$; Fig. 4E,F). In contrast, application of the mixed M1/3R antagonist 4-DAMP (10 μ M) significantly blocked CCh-evoked V_m depolarization (CCh alone: 5.15 ± 2.3 mV vs. CCh and 4-DAMP:

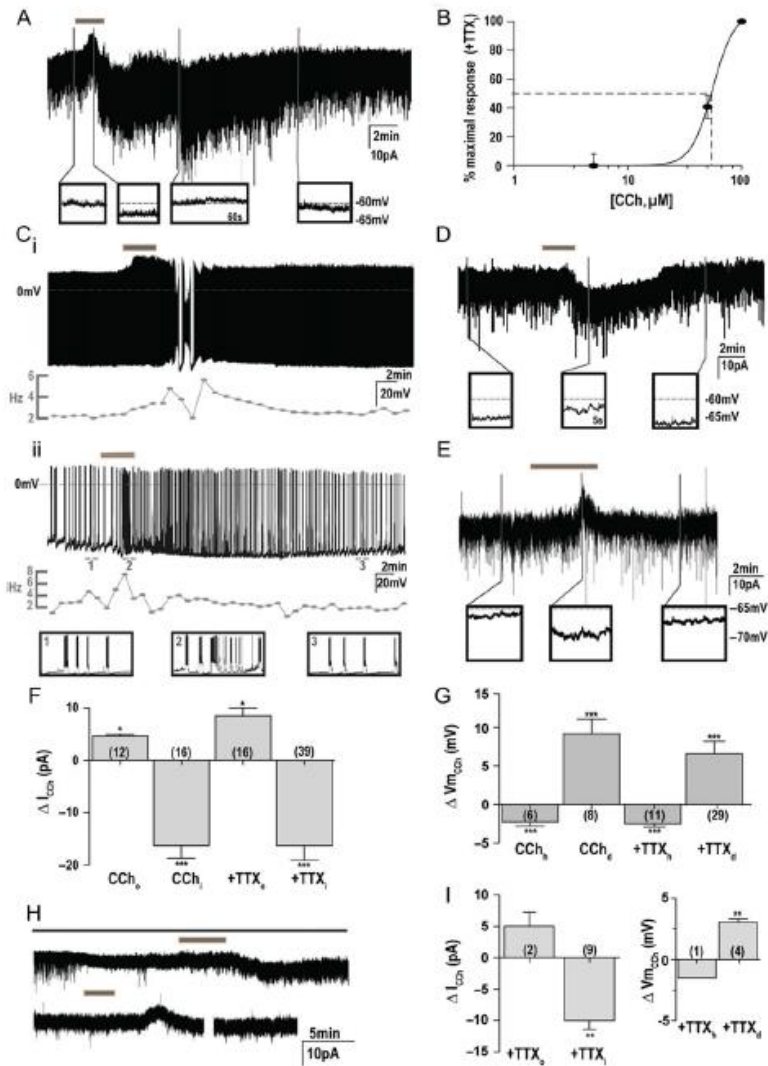


Figure 3. Whole-cell patch-clamp recordings from cortical nNOS/NK1R neurons and their responses to bath-applied carbachol (CCh). (A) The voltage-clamp response to CCh ($50 \mu\text{M}$, gray bar above trace) is mixed, resulting in outward and inward currents that result in hyperpolarization and depolarization of the membrane potential (V_m), respectively (insets below trace). (B) Dose-response curve, based on the inward current response under TTX ($+TTX$), shows that the concentration of CCh used ($50 \mu\text{M}$) is approximately the half-maximal dose. (C) (i-ii) CCh application results in oscillatory activity of the V_m of different nNOS neurons. The firing frequency (60 s bins) of each cell is shown below its recording trace. (D) Isolation of the postsynaptic effect under TTX ($1 \mu\text{M}$) reveals that CCh predominantly depolarizes nNOS/NK1R cells caused by a large inward (CCh_i) current and V_m depolarization (CCh_d; inset below trace). (E) In some cells, CCh evokes an outward (CCh_o) current and V_m hyperpolarization (CCh_h). (F) Summary of the current changes evoked by CCh. (G) Summary of the V_m changes induced by CCh. (H) Voltage-clamp recording in the presence of TTX ($1 \mu\text{M}$), glutamatergic (CNQX, $7 \mu\text{M}$; AP-5, $100 \mu\text{M}$) and GABAergic (2-HS, $5 \mu\text{M}$; BIC, $10 \mu\text{M}$) blockers, and $0 \text{ Ca}^{2+} / 3.3 \text{ Mg}^{2+}$ -containing aCSF [top black bar] demonstrates that CCh application [lower gray bar] evokes a postsynaptic response of an inward (top trace) or mixed outward then inward current (bottom trace). (I) Quantification of the postsynaptic responses to CCh application in the presence of TTX, glutamatergic and GABAergic blockers, and $0 \text{ Ca}^{2+} / 3.3 \text{ Mg}^{2+}$ -containing aCSF (** $P < 0.001$; * $P < 0.01$; * $P < 0.05$; n.s., nonsignificant; one-way ANOVA; the break in the trace in H is from switching between recording modes for $> 10 \text{ s}$).

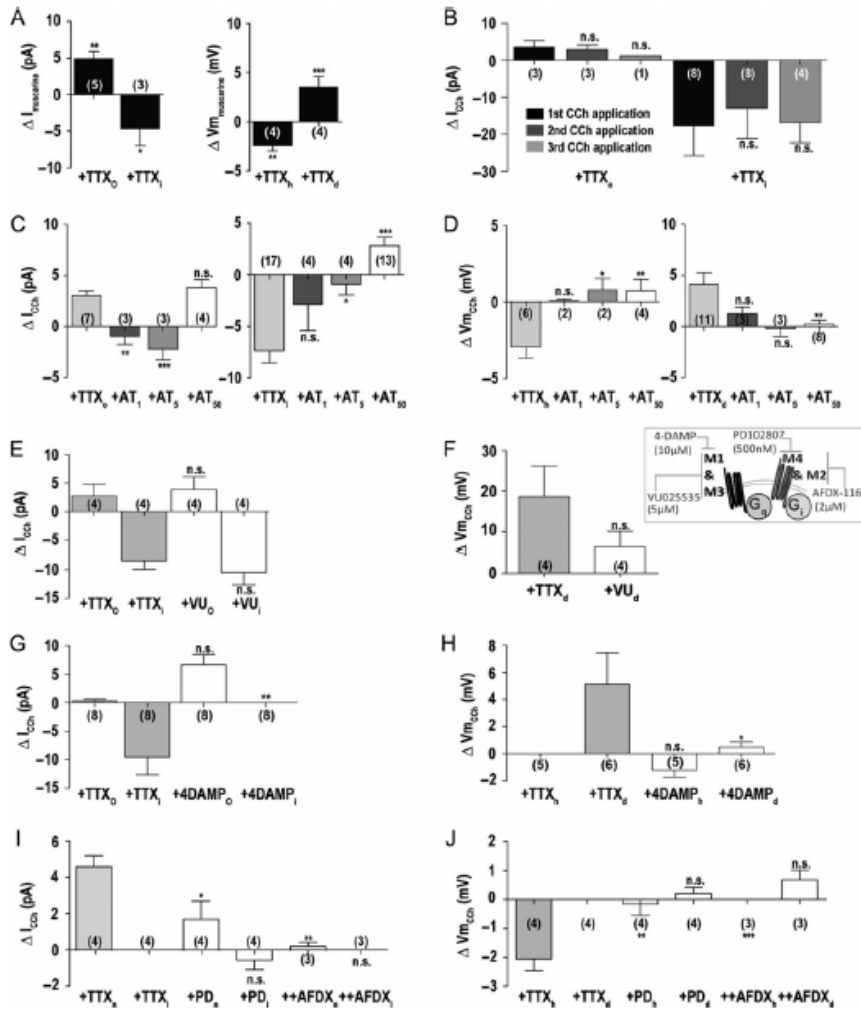


Figure 4. Pharmacological isolation of the mAChR subtypes in TTX reveals a predominant role for M4 and M3 mAChRs. (A) In TTX, application of the nonselective mAChR agonist, muscarine (10 μ M) in voltage and current-clamp configurations, supports a role for mAChRs on nNOS/NK1R neurons. (B) Repetitive application of CCh does not result in reduction in the magnitude of responses between applications. (C) In TTX, CCh-evoked changes in current are reduced by AT (1, 5, and 50 μ M), as are (D) CCh-mediated changes in membrane potential (V_m). (E) Current and (F) V_m changes in the absence and presence of the M1R antagonist VU025535 (5 μ M) demonstrates that the CCh response is not significantly affected by blocking M1Rs. (G, H) Blockade of both M1R and M3R by 4-DAMP (10 μ M) eliminates the excitatory response of CCh. (I, J) Application of the M4R antagonist PD102807 (500 nM) significantly reduces the CCh-evoked inhibitory responses; these responses are eliminated by the M2R/M4R antagonist AFDX-116 (2 μ M) (** P < 0.001; * P < 0.01; * P < 0.05; n.s., nonsignificant).

0.48 \pm 0.39 mV; n = 6; one-way ANOVA, P < 0.05), and the current direction was reversed (CCh alone: -9.57 ± 3.08 pA vs. CCh and 4-DAMP: 6.67 ± 1.79 pA; n = 8; one-way ANOVA, P < 0.001). This reversal was mirrored by V_m hyperpolarization in 66% of cells previously excited by CCh (-1.22 ± 0.51 mV; n = 4; P < 0.01; Fig. 4G,H). These data suggest that M3Rs are preferentially expressed on the postsynaptic membrane of nNOS/NK1R cells.

To determine which mAChRs were responsible for the CCh-mediated postsynaptic inhibition on nNOS/NK1R cortical neurons, we utilized antagonists for the G_q-coupled M2R and M4R (Fig. 4I,J). Application of the M4R antagonist PD102807 (500 nM) significantly reduced the outward current evoked by CCh (CCh alone: 4.74 ± 0.63 pA vs. CCh and PD: 1.77 ± 1.03 pA; n = 4; P < 0.05; Fig. 4I) as well as V_m hyperpolarization

(CCh alone: -2.05 ± 0.4 mV vs. CCh and PD: -0.15 ± 0.40 mV; $n = 4$; $P < 0.01$; Fig. 4). When repeated with the addition of the M2R antagonist AFDX-116 ($2 \mu\text{M}$), the residual CCh-evoked outward current and V_m hyperpolarization was eliminated (0.23 ± 0.23 pA, $n = 3$ and 0.00 ± 0.00 mV, $n = 4$). These data suggest that nNOS/NK1R cells also express functional post-synaptic M2Rs and M4Rs.

Next, we performed scRT-PCR after whole-cell patch-clamp recordings (Fig. 5A). The results from 13 cells identified with SP-TMR support the pharmacological findings that M1R, M3R and M4R are the predominant mAChR subtypes expressed on cortical nNOS/NK1R neurons (Fig. 5B).

mAChR-Mediated Regulation of Glutamatergic Input to Cortical nNOS/NK1R Cells

As indicated by the oscillatory changes in current and V_m in nNOS/NK1R neurons (Fig. 3C), CCh likely affects network activity to indirectly regulate these neurons. Therefore, we determined whether these indirect responses were due to changes in presynaptic glutamatergic input (Fig. 6). We found that CCh application increased sEPSC frequency ($+749 \pm 17\%$, RM-ANOVA, $P < 0.001$; K-S test, $P < 0.01$; $n = 12$; Fig. 6A). Since sEPSC activity may be driven by CCh-induced action potentials elsewhere in the slice, we also examined mEPSCs by repeating the experiment in the presence of TTX ($1 \mu\text{M}$). Under TTX, CCh significantly reduced mEPSC activity compared to baseline ($60.53 \pm 0.85\%$, $n = 26$; RM-ANOVA, $P < 0.0001$; K-S test, $P < 0.01$; Fig. 6B). Overall, there was no significant change in the amplitude of sEPSCs (K-S test, $P > 0.05$, $n = 10$ of 12 cells) or mEPSCs (K-S test, $P > 0.09$, $n = 14$ of 21 cells) with CCh application. Cells that showed amplitude changes in sEPSCs (16% of cells recorded) and mEPSCs (36% of cells recorded) had an increased number of low amplitude events compared to baseline conditions (K-S test, $P < 0.02$, $n = 2$ of 12 cells and K-S test, $P < 0.03$, $n = 8$ of 22 cells, respectively).

To determine the type of cholinergic presynaptic receptors mediating the reduction in glutamatergic input by CCh, we examined the effect of mAChR antagonists on mEPSCs. CCh reduced mEPSC frequency in 75% of cells tested in the presence of the M1R antagonist VU025535 ($5 \mu\text{M}$; $59.20 \pm 1.57\%$, RM-ANOVA, $P < 0.0001$; K-S test, $P < 0.01$; $n = 3$ of four cells; Fig. 6C) or the M4R antagonist PD102807 (500 nM; $70.72 \pm 4.31\%$, RM-ANOVA, $P < 0.001$; K-S test, $P < 0.002$; $n = 3$ of four cells; Fig. 6E). In 25% of cells, VU025535 and PD102807 blocked the CCh-induced reduction of mEPSCs (K-S test, $P = 0.50$, $n = 1$ of four cells; and K-S test, $P = 0.80$, $n = 1$ of four cells, respectively), while application of the M4 antagonist PD with the M2 antagonist AFDX-116 ($2 \mu\text{M}$) blocked the effect of CCh in 75% of cells ($83.25 \pm 5.13\%$, $P < 0.05$; K-S test, $P < 0.04$, $n = 4$; Fig. 6E). These data suggest M1R and M4R are not the main contributors to the presynaptic reduction in glutamatergic tone onto nNOS/NK1R neurons by CCh. Conversely, independent preapplication of the M1/M3 antagonist 4-DAMP ($10 \mu\text{M}$; $116.3 \pm 7.63\%$, RM-ANOVA, $P > 0.20$; K-S test, $P > 0.16$, $n = 3$; Fig. 6D) or AT (1 , 5 , $50 \mu\text{M}$; K-S test, $P > 0.18$, $n = 18$; Fig. 6G) each blocked the reduction in frequency of mEPSCs. In addition, both 4-DAMP and AT_{50} presynaptic blockade resulted in an increase in mEPSC activity in some cells (K-S test, $P < 0.01$, $n = 2$ of five cells and K-S test, $P < 0.01$, $n = 2$ of six cells, respectively). We found that any change in amplitude of mEPSCs by CCh was unaffected in the presence of the different mAChR antagonists tested (+AT₁, $n = 10$; $101.7 \pm 1.81\%$, $n = 4$, $92.48 \pm 1.79\%$, $n = 4$, and $97.38 \pm 1.92\%$, $n = 6$ respectively; +VU: $93.26 \pm 1.29\%$, $n = 4$; +4-DAMP: $101.1 \pm 2.81\%$, $n = 5$; PD: $93.17 \pm 1.02\%$, ++AFDX: $94.46 \pm 1.30\%$, $n = 4$; all results compared to baseline mEPSC amplitude). The application of muscarine ($10 \mu\text{M}$), a nonselective mAChR agonist, similarly decreased mEPSCs onto cortical nNOS/NK1R neurons ($52.07 \pm 1.20\%$, $n = 7$; RM-ANOVA, $P < 0.0001$; K-S test, $P < 0.05$; Fig. 6F). Together, these data indicate that presynaptic M3Rs, with contribution from M2Rs, mediate CCh-induced inhibition of glutamatergic input onto cortical nNOS/NK1R cells.

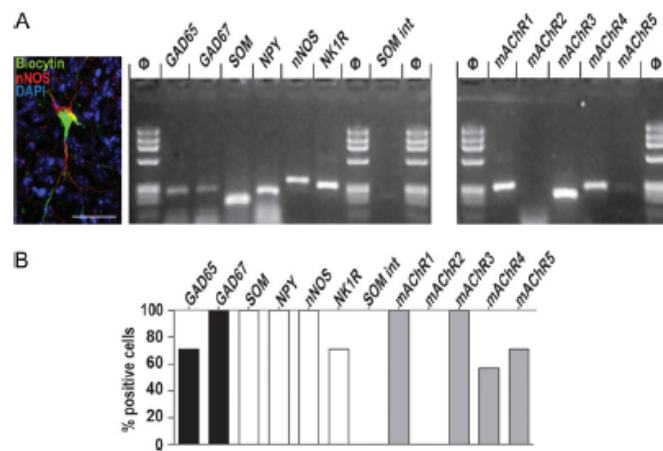


Figure 5. scRT-PCR from nNOS/NK1R cells confirm multiple mAChR subtypes. (A) Left: Confocal image of a SP-TMR-identified cortical nNOS/NK1R neuron sampled for scRT-PCR (scale bar = $60 \mu\text{m}$). Middle: scRT-PCR confirms cell contents were from a GABAergic interneuron that expressed Somatostatin (SOM), Neuropeptide Y (NPY), nNOS and NK1R. Right: scRT-PCR indicates that this cell expressed the M1, M3, M4, and M5 mAChR receptor subtypes. (B) Proportion of neurons expressing each transcript in the nNOS cell population sampled ($n = 7$). To eliminate potential false positives for the mAChRs, only cells negative for the somatostatin intron (SOM int) were included in the analysis (⊖, molecular weight marker).

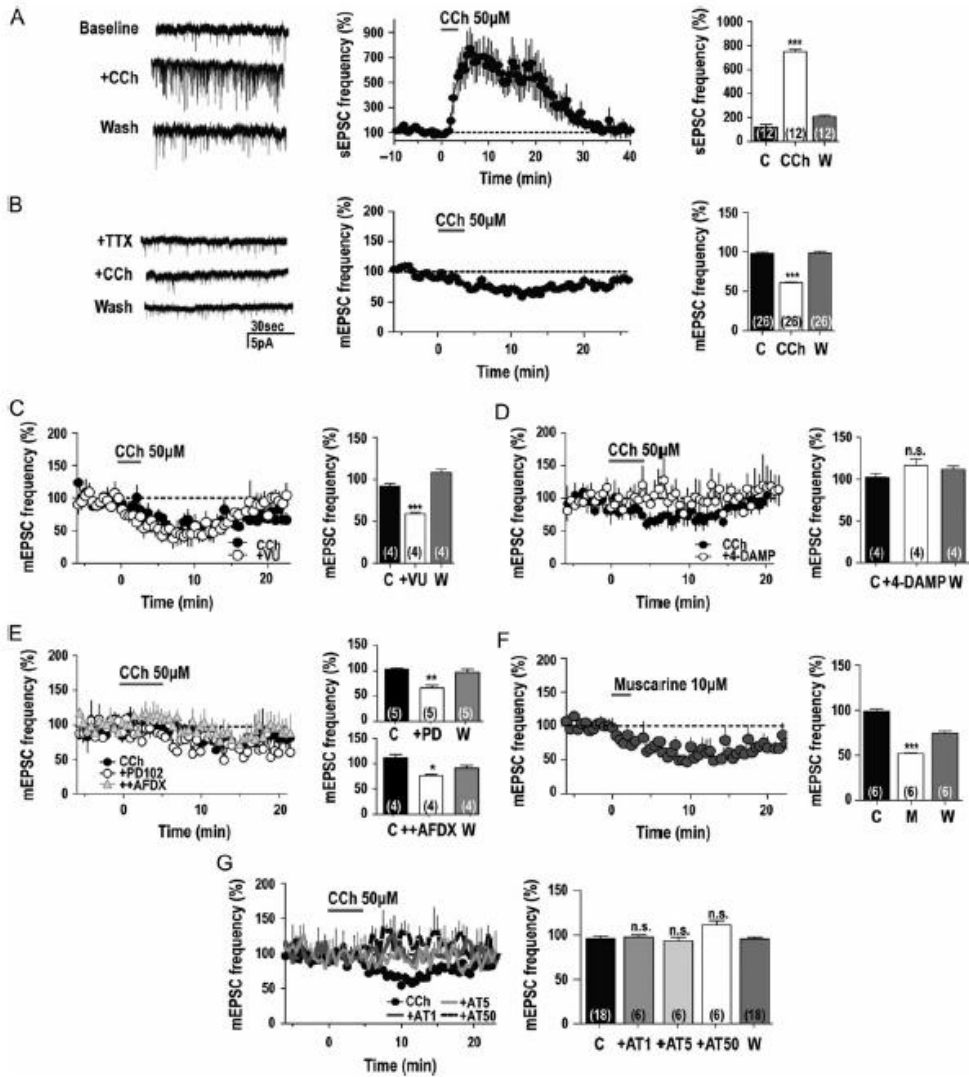


Figure 6. CCh affects presynaptic glutamate release onto cortical nNOS/NK1R cells. (A) CCh increases spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). (B) However, CCh reduces miniature EPSCs (mEPSCs). (C–E) Pharmacological antagonism at different mAChRs reveals CCh-decreased mEPSCs are predominantly mediated by M2Rs. (F) Muscarine, a nonselective mAChR agonist, reduces mEPSCs similarly to CCh. (G) Pharmacological blockade of mAChRs with atropine (at all concentrations) blocks the presynaptic reduction in mEPSCs. AFDX, AFDX-116; AT, atropine; C, Control; CCh, carbachol; M, muscarine; PD, PD102807; VU, VU1025535; W, washout (***P* < 0.001; **P* < 0.01; **P* < 0.05; n.s., nonsignificant).

nAChRs Also Contribute to Cholinergic Effects on Cortical nNOS/NK1R Cells

Since CCh also activates nAChRs, we examined whether nAChR activation contributed to CCh-evoked responses on nNOS/NK1R

cells. Due to the fast desensitization kinetics of nAChR, a single application of nicotine (NIC, nAChR agonist; 5 μM) per slice was studied. When we applied NIC with TTX, the predominant electrical response was an outward current (4.30 ± 0.67 pA, n = 8;

paired t-test, $P = 0.0004$; Fig. 7A,B) although, in two cells, NIC application caused an inward current (-19.99 ± 14.62 pA; Fig. 7B). In current clamp, NIC evoked V_m hyperpolarization (-2.34 ± 0.74 mV, $n = 7$; paired t-test, $P = 0.02$) or depolarization (2.83 ± 0.81 mV, $n = 4$; paired t-test, $P = 0.04$; Fig. 7C). We also confirmed a postsynaptic response by applying NIC in the presence of TTX, blockers for both glutamate (CNQX, $7 \mu\text{M}$ and AP-5, $100 \mu\text{M}$) and GABA (BIC, $10 \mu\text{M}$ and 2-IBS, $5 \mu\text{M}$), and $0 \text{ Ca}^{2+}/3.3 \text{ Mg}^{2+}$ -containing aCSF (Fig. 7C,D). Under these conditions, excitatory responses were -14.97 ± 4.71 pA ($n = 3$ of 4, one-way ANOVA, $P < 0.05$) and $+7.41 \pm 0.12$ mV ($n = 2$) with one cell showing an initial inhibitory response ($+4.59$ pA and -3.43 mV). This contrasted with the previously acquired results, suggesting NIC actions may be more complex on cortical nNOS/NK1R neurons. CCh modulation of mEPSCs was confirmed to be a mAChR-dependent mechanism since application of NIC had no effect on either mEPSC frequency ($104.4 \pm 5.79\%$, RM-ANOVA, $P = 0.07$; K-S test, $P < 0.04$; $n = 9$ of nine cells; Fig. 7E) or amplitude (K-S test, $P > 0.16$; $n = 9$ of nine cells; data not shown).

We performed scRT-PCR on the cytoplasm taken from patched cortical nNOS/NK1R neurons, identified with SP-TMR, to determine nAChR expression. Results indicated that the nAChR beta2 subunit was the predominant subunit in these cells (Fig. 7F,G), indicating that nAChRs on cortical nNOS/NK1R cells are mainly of the non- $\alpha 7$ subtype (i.e., dihydro-beta-erythroidine (DhbetaE)-sensitive).

Since cortical nNOS neurons share some similarities with stratum oriens-lacunosum moleculare (OLM) interneurons which are known to express the nAChR $\alpha 2$ subunit and this subunit has been found in deep cortical layers (Leao et al. 2012), we determined whether $\alpha 2$ expression exists on cortical nNOS/NK1R neurons using a *Chma2* reporter mouse and immunohistochemistry for nNOS. *Chma2-cre* mice express tdTomato reporter under control of the nAChR $\alpha 2$ subunit promoter. We found only one nNOS neuron that colocalized with a *Chma2-cre*; *R26^{fl}*-identified cell in all sections counted (total nNOS cells: 8.19 ± 0.70 , total *Chma2-cre*; *R26^{fl}* cells: 41.19 ± 1.34 ; Fig. 7H). These data support the scRT-PCR analysis which indicated that expression of the nAChR $\alpha 2$ subunit is low in cortical nNOS/NK1R neurons.

Juvenile Mice Increase c-FOS Expression in nNOS/NK1R Neurons During RS After Sleep Deprivation

As indicated above, the extensive autofluorescence in the adult mouse brain limits the use of SP-TMR to identify cortical nNOS cells for cellular electrophysiological studies to young animals. On the other hand, activation of nNOS/NK1R neurons during sleep has been described in three species of adult rodents (Gerashchenko et al. 2008; Pasumarthi et al. 2010; Morairty et al. 2013; Dättrich et al. 2015) but has not previously been examined in juvenile animals. Therefore, we measured c-FOS expression in nNOS/NK1R cells within the same cortical region of young mice that was targeted for electrophysiological recordings (Fig. 8A,B). Juvenile (P19-21) mice subjected to 4 h SD starting at ZT0 demonstrated little c-FOS colocalization in cortical nNOS/NK1R cells (4 h SD: $2.12 \pm 0.84\%$, $n = 4$). However, young mice given a 90 min sleep opportunity following the 4 h SD demonstrated a significantly increased proportion of cFOS/nNOS neurons ($17.63 \pm 1.41\%$, $n = 4$; one-way ANOVA with Bonferroni posttest, $P < 0.001$). This increased colocalization was a reflection of the sleep opportunity following extended wakefulness because undisturbed ("undistB") mice, time-matched for both

groups (Fig. 8B), did not show significant c-FOS/nNOS (ZT4: $1.67 \pm 1.04\%$, $n = 3$; ZT5.5: $3.33 \pm 3.33\%$, $n = 3$). These data demonstrate a role for cortical nNOS/NK1R cells as cellular markers of sleep homeostasis in juvenile (P19-21) as well as adult mice and support the rationale for the in vitro neurophysiological studies of cortical nNOS/NK1R neurons.

Sleep Deprivation Does Not Affect the Type of Response of Cortical nNOS/NK1R Neurons to CCh Application But Does Affect Glutamatergic Input

Cholinergic release from the BF to the cortex is highest during waking and REM sleep (Jasper and Tessier 1971; Vazquez and Baghdoyan 2001) yet cortical nNOS/NK1R neurons show low c-FOS expression during these states (Morairty et al. 2013). To determine whether the BF cholinergic pathway is related to the hypothesized role of cortical nNOS/NK1R neurons in sleep homeostasis, we determined the response of nNOS/NK1R neurons to CCh application in mice (P14-23) that had been sleep deprived for 4 h prior to sacrifice.

We found that the voltage-clamp and current-clamp responses to CCh ($50 \mu\text{M}$) application were unaffected by prior wake history, with a predominant response of an inward current (CCh alone: -10.01 ± 1.99 pA; $n = 9$; CCh in TTX: -8.38 ± 1.82 pA; $n = 8$; Fig. 8C) and depolarization (CCh alone: 6.29 ± 1.18 mV; $n = 9$; CCh in TTX: 4.03 ± 0.79 mV; $n = 7$; Fig. 8D) comparable to CCh responses in undisturbed mice (Fig. 3F,G). Next, we measured the effect of SD on glutamatergic input. With 4 h SD, we found that CCh application increased sEPSCs onto cortical nNOS/NK1R cells ($+327.5 \pm 26.46\%$, RM-ANOVA, $P < 0.001$; K-S test, $P < 0.05$; $n = 6$; Fig. 8E), similar to the CCh effect recorded in brain slices from undisturbed mice ($+749 \pm 16.99\%$, RM-ANOVA, $P < 0.001$; K-S test, $P < 0.01$; $n = 12$). Nevertheless, the CCh-mediated effects on the glutamatergic inputs were blunted in magnitude and duration. In the presence of TTX ($1 \mu\text{M}$), the reduction in mEPSCs by CCh from baseline was also observed ($71.08 \pm 4.19\%$, RM-ANOVA, $P < 0.001$; K-S test, $P < 0.04$; $n = 4$; Fig. 8F) and was comparable to the CCh response of undisturbed mice.

Since the effect of CCh sEPSCs could indicate altered composition of membrane receptors, we next measured the basal levels of glutamatergic tone prior to any CCh application. We found that SD increased the number of sEPSCs onto cortical nNOS/NK1R cells (undistB: 0.25 ± 0.03 Hz, $n = 5$; SD: 0.55 ± 0.04 Hz, $n = 4$; one-way ANOVA, $P < 0.001$; Fig. 8G, left panel), although the amplitude was decreased (undistB: 8.10 ± 0.13 pA, $n = 5$; SD: 6.30 ± 0.11 pA, $n = 4$; one-way ANOVA, $P < 0.001$; Fig. 8G, right panel). In TTX ($1 \mu\text{M}$), SD decreased mEPSCs relative to control levels (undistB: 0.46 ± 0.03 Hz, $n = 5$; SD: 0.33 ± 0.03 Hz, $n = 7$; one-way ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 8H, left panel) but the amplitude was not significantly different (undistB: 6.10 ± 0.09 pA, $n = 5$; SD: 5.77 ± 0.11 pA, $n = 4$; one-way ANOVA, $P > 0.05$; Fig. 8H, right panel). In addition, the application of TTX significantly increased the number of glutamatergic events and decreased the amplitude of such events in undisturbed mice (frequency: $+40.21 \pm 0.00$ Hz, $n = 5$, one-way ANOVA, $P < 0.001$; amplitude: -42.00 ± 0.04 pA, $n = 5$, one-way ANOVA, $P < 0.001$). In contrast, TTX significantly reduced both the number and amplitude of glutamatergic events in SD mice (frequency: -40.22 ± 0.01 Hz, $n = 4$ vs. 7, one-way ANOVA, $P < 0.001$; amplitude: -40.53 ± 0.00 pA, $n = 4$ vs. 5, one-way ANOVA, $P < 0.01$). These data suggest that extended wakefulness alters the glutamatergic tone, whereby there is more action potential-driven

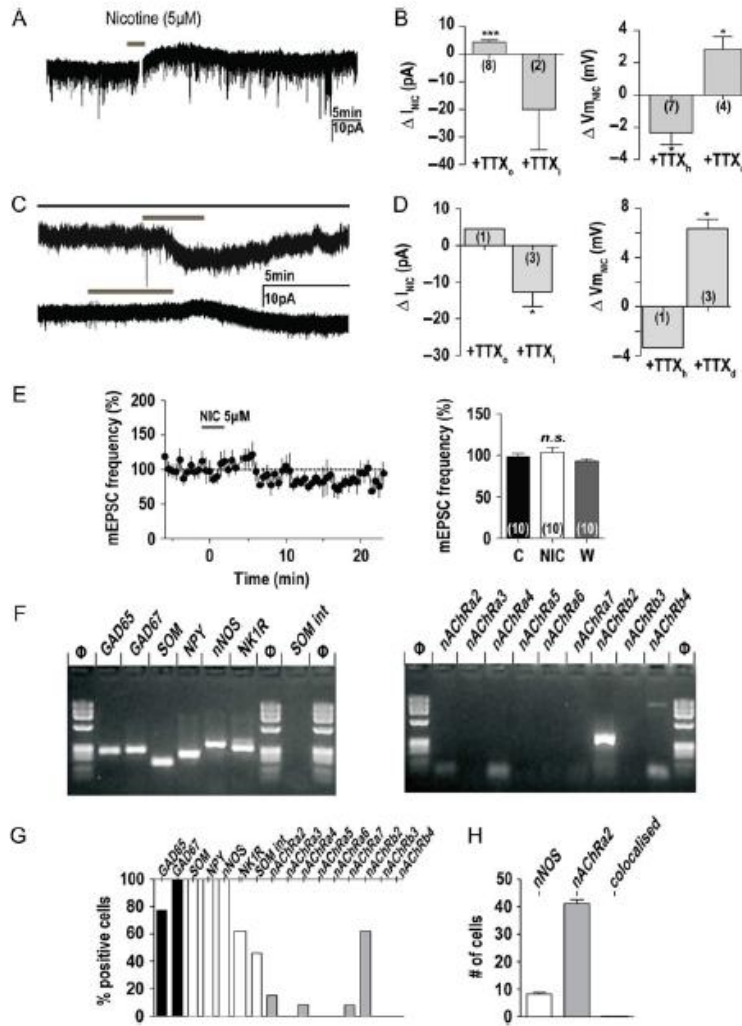


Figure 7. CCh affects nNOS/NK1R excitability via nAChRs. (A) Voltage-clamp recording of an outward response to nicotine (NIC, 5 μ M, gray bar) in TTX (1 μ M). (B) NIC evoked both outward and inward currents (left column) and membrane potential (V_m) hyperpolarization or depolarization (right column). (C) Voltage-clamp recording in the presence of TTX (1 μ M), glutamatergic (CNQX, 7 μ M, AP-5, 100 μ M) and GABAergic (2-HS, 5 μ M, BIC, 10 μ M) blockers in 0 Ca^{2+} /3.3 Mg^{2+} -containing aCSF [top black bar] demonstrates that NIC application [lower gray bar] evokes a postsynaptic response of either an inward (top trace) or a mixed outward then inward current (bottom trace). (D) Quantification of the postsynaptic responses to NIC application in the presence of TTX, glutamatergic and GABAergic blockers in 0 Ca^{2+} /3.3 Mg^{2+} -containing aCSF. (E) NIC does not reduce glutamatergic mEPSCs as CCh does, suggesting that nAChRs do not have a major role in this CCh effect. (F) scRT-PCR results confirming cell contents analyzed are from a GABAergic SOM/NPY/nNOS/NK1R interneuron which expresses mRNAs for the nAChR β 2 subunit. (G) Proportion of nNOS cells expressing each transcript in the population sampled (n = 13). (H) Quantification of cortical nNOS/NK1R cells and Chrm2-containing cortical neurons indicate extremely low colocalization (n = 2 mice), supporting the scRT-PCR results indicating low expression levels of nAChR β 2 subunit mRNA in nNOS/NK1R neurons (** P < 0.01, ** P < 0.01; * P < 0.05; n.s., nonsignificant; break in trace in A is from switching between recording modes for >10 s).

release of glutamate yet the spontaneous release of glutamate is actually reduced. Therefore, we suggest that the type of response of cortical nNOS/NK1R neurons to BF cholinergic

innervation is not directly dependent on waking history, but that cortical network activity can modify the magnitude of the response to cholinergic stimulation.

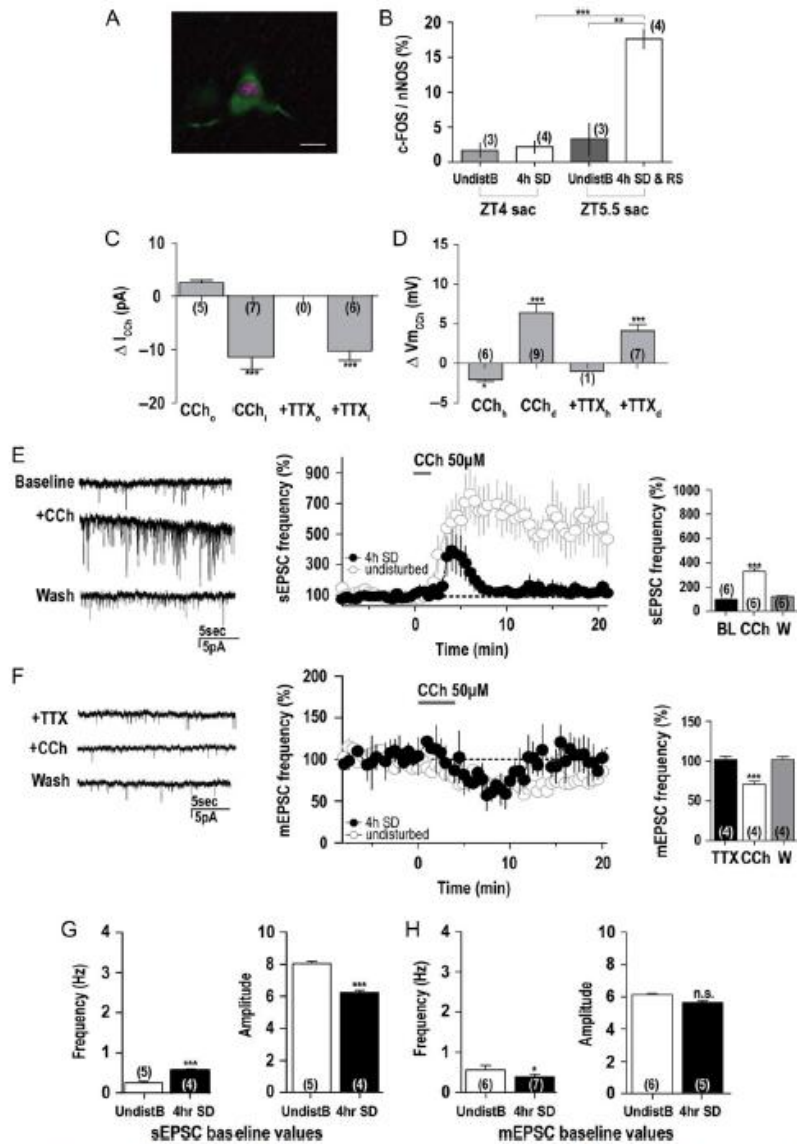


Figure 8. Sleep deprivation in juvenile mice and the effect on cortical nNOS/NK1R neuronal responsiveness to CCh. (A) c-FOS (magenta) expression in a cortical nNOS neuron (green) from a young mouse (P21) during a RS opportunity following 4 h sleep deprivation (SD). (B) Quantification of nNOS/NK1R cells expressing c-FOS in young mice (P19–21) that were either left undisturbed (“UndistB”), subjected to 4 h SD, or provided a 90 min RS opportunity after 4 h SD. (C) The effect of CCh bath application (50 μ M) on current and (D) membrane potential (V_{mCa}) of SP-TMR-identified cortical nNOS/NK1R neurons in brain slices from juvenile mice previously exposed to 4 h SD. No significant differences were seen when compared to undisturbed controls (see Fig. 3F,C). (E) CCh significantly increases spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) in a similar manner to undisturbed mice, although the magnitude and duration of the response is blunted. Compare to Fig. 6A. (F) CCh reduces miniature EPSCs (mEPSCs) in brain slices from 4 h SD mice similarly to undisturbed controls but, again, the duration of the response is blunted. Compare to Fig. 6B. (G) Basal glutamatergic tone (frequency and amplitude of events) differs significantly between undisturbed (“UndistB”) and SD mice for both sEPSCs and (H) mEPSCs. These differences may account for the ceiling effect of CCh recorded on sEPSCs and a floor effect on mEPSCs. Application of TTX significantly reduced the amplitude of events in both undisturbed and SD mice whereas it increased and decreased their frequency in undisturbed and SD mice, respectively. Scale bar in A = 25 μ m (BL, baseline; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; n.s., nonsignificant).

Electrical Response of nNOS/NK1R Cells to CCh is Not Affected by Time of Day

To further assess whether prior sleep/wake history of the mouse from which slices were taken could affect the cholinergic responses on nNOS/NK1R neurons, we plotted the responses according to time of day. We found that the magnitude and direction of response to CCh bath application did not differ between slices taken at the beginning of the light cycle, when sleep pressure is typically high, and slices prepared just before lights off, when sleep pressure is low (Fig. 9A). Furthermore, there was no regional localization of the cortical nNOS cells recorded in this study that (i) responded to optogenetic stimulation of cholinergic terminals, (ii) displayed either excitatory or inhibitory responses to bath application of CCh, or (iii) colocalized with c-FOS following sleep opportunity after sleep deprivation. Fig. 9B summarizes the locations of the cortical nNOS neurons examined in this study.

Discussion

Projections from the BF to the cortex (Shute and Lewis 1967; Eckenstein et al. 1988; Jimenez-Capdeville et al. 1997; Henny

and Jones 2008) are strongly implicated in cortical arousal and sleep/wake (Semba 1991; Brown et al. 2012). BF cholinergic neurons, located in the MCPO/SI, project throughout the cortex and mAChRs and nAChRs are densely expressed on cortical neurons. Multiple studies have demonstrated that the presence of different ACh ionotropic and metabotropic receptors across cortical layers enables ACh to be either excitatory or inhibitory, presumably depending upon the activity state of cortical cells and input from GABAergic interneurons (Kawaguchi 1997; Gullledge et al. 2007). The maximal firing state of cholinergic BF cells is a bursting pattern that is associated with cortical activation and which occurs during active wake and paradoxical sleep, states that are correlated with EEG gamma and theta activity (Lee et al. 2005). Accordingly, BF and cortical ACh levels vary across sleep/wake states (Jasper and Tessier 1971; Marrosu et al. 1995; Vazquez and Baghdoyan 2001). Optogenetic activation of BF cholinergic cells during NREM sleep promotes transitions to wakefulness (Han et al. 2014; Imak and de Lecea 2014) while chemogenetic activation of BF ChAT cells decreases EEG delta power (Anacleit et al. 2015; Chen et al. 2016), supporting the concept that cortical ACh release from the BF promotes arousal. In contrast, cortical nNOS/NK1R cells, located in layer

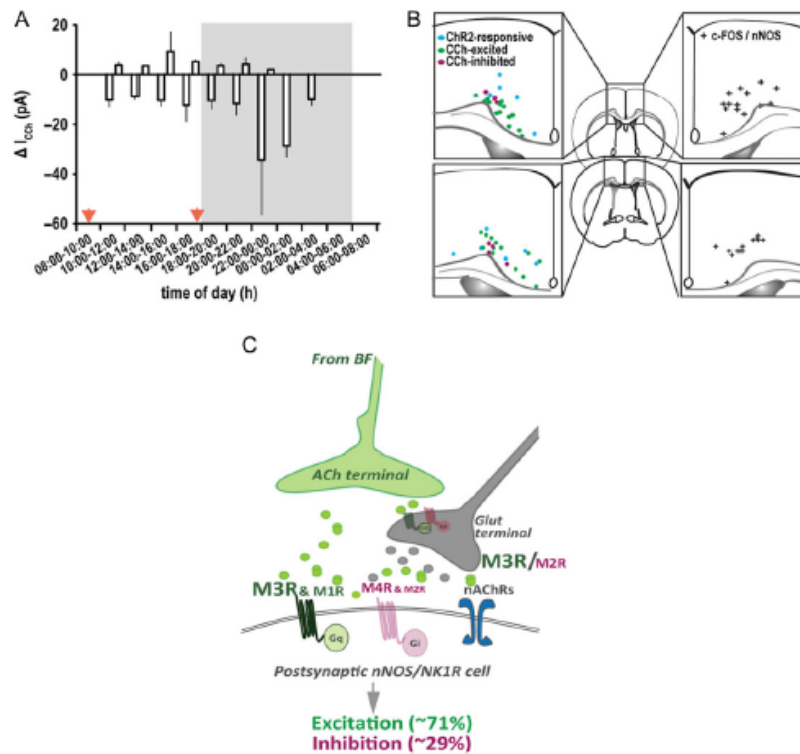


Figure 9. CCh responses on nNOS/NK1R cells do not appear to be affected by time of day, age of mouse or cortical region. (A) Time course suggests the CCh-mediated effect on current is not affected by time of day or time of sacrifice (red arrows). (B) Schematic indicating localization of some of the cortical nNOS/NK1R cells used for this study. No discernible pattern relative to the response to cholinergic stimulation or colocalization with c-FOS was found. (C) Schematic summarizing the receptors involved in mediating cholinergic responses from putative BF projections onto cortical nNOS/NK1R cells.

V-VI, express c-FOS during sleep and the percentage of c-FOS-positive nNOS/NK1R neurons directly correlates with NREM sleep time, NREM bout duration and EEG δ power during NREM sleep (Morairty et al. 2013). Consequently, we investigated the effects of cholinergic afferents on cortical nNOS/NK1R cells in the present study.

Electrophysiological Characterization of Cortical nNOS/NK1R Neurons

The electrophysiological characteristics of cortical nNOS/NK1R neurons were comparable in juvenile and adult mice. For example, we found that nNOS/NK1R neurons had R_{in} , cell capacitance, RMP and steady-state frequency values that were in concordance with previous reports (Dittrich et al. 2012; Perrenoud et al. 2012, 2013). Further pharmacological isolation of specific currents generated in cortical nNOS/NK1R neurons would help characterize the underlying features of these cells and may enable better insight into possible mechanisms of electrical modulation of these neurons.

BF Cholinergic Projection to Cortical nNOS/NK1R Neurons

Since cholinergic innervation spans layer V-VI and projects to nNOS-containing cells in the rat (Vaucher et al. 1997) and since BF stimulation increases c-FOS in nNOS cells (Kocharyan et al. 2008), we investigated the effects of BF-derived ACh on nNOS/NK1R cortical neurons. We found BF anterograde-labeled fibers close to the dendritic field and cell bodies of deep layer nNOS/NK1R neurons located near the cingulum within the cingulate cortex. Moreover, we found that some of these projections are contralateral which may permit bihemispheric control by the BF, potentially via modulation of these neurons, to mediate cortical desynchronization and arousal. A contralateral BF projection to cortical nNOS neurons was previously suggested based on BF stimulation in the rat (Kocharyan et al. 2008). Here, we provide anatomical evidence from the mouse brain to support this observation. Our optogenetic data suggests a functional cholinergic component to the basalcortical projection onto cortical nNOS/NK1R neurons, and our pharmacological assessments demonstrate cholinergic input generally excites nNOS/NK1R neurons.

Response of Cortical nNOS/NK1R Neurons to Cholinomimetics

We observed that the CCh evoked biphasic responses in nNOS/NK1R cells characterized by oscillatory behavior of both V_m and firing rate, and outward followed by inward currents. The predominant direct response to CCh application was depolarization of nNOS/NK1R cells (~71% of cells recorded). This response was mediated primarily by postsynaptic M3Rs and some nAChRs.

Activation of nAChRs on nNOS/NK1R neurons by NIC mainly evoked an outward current and hyperpolarization. However, the inhibitory response was largely abolished in the presence of TTX, blockers for both glutamate (CNQX, 7 μ M and AP-5, 100 μ M) and GABA (BIC, 10 μ M and 2-HS, 5 μ M), and 0 Ca^{2+} /3.3 Mg^{2+} -containing aCSF. The mechanism behind this inhibitory response is currently unclear and warrants further investigation, but may involve a Ca^{2+} -dependent K^+ conductance (Wong and Gallagher 1989). The occurrence of both ionotropic and metabotropic mechanisms may facilitate temporal control of

nNOS/NK1R neurons in response to waking history via cholinergic signaling. Some SOM-containing interneurons are excited by CCh and the mAChR agonist muscarine (Kawaguchi 1997; Gullledge et al. 2007; Fanselow et al. 2008). Since the nNOS/NK1R cells are a subset of the SOM interneurons (Kubota et al. 2011), these results are directly relevant to those presented here.

Neurons that demonstrated CCh-induced inhibition (~29% of cells recorded) were found to predominantly express functional postsynaptic M4R, with possibly some contribution from M2R. The scRT-PCR analysis supported our pharmacological findings that the main receptor subtypes on cortical nNOS/NK1R neurons are M1R, M3R, M4R, and the nAChR beta4 subunit. Although the M2R was suggested by our pharmacological studies as possibly contributing to the inhibitory postsynaptic mAChR response, scRT-PCR did not detect any cells that expressed M2R. This discrepancy may be due to a lack of antagonist specificity against M2R relative to M4R, or may be a result of the limited number of cells sampled for scRT-PCR. Thus, although our data for M2R expression on cortical nNOS neurons may be inconclusive, other mAChRs are clearly more abundantly expressed. In addition, the detection of M1R mRNA in the absence of an effect of the M1R antagonist may be due to presynaptic localization of M1R in nNOS cells. The effects of presynaptic receptors are hardly observable with somatodendritic recordings. Addressing this point with immunohistochemistry is beyond the scope of the present study but would be of interest. Alternatively, it may be that the M1R mRNAs are not efficiently translated in these cells. M1R- and M3R-mediated cholinergic modulation is a major source of excitatory input to cortical SOM interneurons (Munoz et al. 2017), which are a superset of cortical nNOS/NK1R cells. scRT-PCR also indicated the presence of the M5R which we did not address with pharmacological tools.

Since nicotinic and muscarinic receptors appear in brain development as early as E10-E13 (Abreu-Vilaca et al. 2011), their expression in juvenile mice can be expected to resemble that in adult mice. Indeed, bath application of CCh onto cortical nNOS/NK1R cells from adult mice evoked responses comparable to those observed in juvenile brain slices (Fig. S2). Although our scRT-PCR data report mRNA rather than protein expression, the pharmacological results presented herein indicate that most of these mRNA transcripts are translated into receptor proteins that are expressed on the cell membrane. This combined molecular/pharmacological approach to determine receptor expression has been used in other studies (Porter et al. 1999; Gallopin et al. 2006; Ferezou et al. 2007; Hill et al. 2007).

Isolation of the mEPSCs demonstrated that CCh evoked a reduction in glutamatergic input (~40% decrease) onto nNOS/NK1R cells, which was attributable to presynaptic M3R and some M2R. M2R has been classified as a presynaptic autoreceptor to decrease synaptic release (Thiele 2013). In addition, there is increasing evidence for a role of M3R to presynaptically regulate neural excitability (Grillner et al. 1999; Shen and Johnson 2000; Li et al. 2004). These data suggest a role for M3Rs and M2Rs to presynaptically regulate the excitability of cortical nNOS/NK1R cells, in addition to the postsynaptic effects we observed.

Functional Significance of Cholinergic Modulation of Cortical nNOS/NK1R Neurons

Given the role of cholinergic BF signaling in cortical desynchronization (Metherate et al. 1992; Metherate and Ashe 1993; Chen

et al. 2016), we found the excitatory effect of cholinomimetics on cortical nNOS/NK1R neurons to be paradoxical since our previous studies indicated that Fos expression in these neurons is related to prior sleep/wake history (Dittrich et al. 2015). To address this paradox, we evaluated whether Fos induction in cortical nNOS/NK1R cells was age-dependent by determining c-FOS/nNOS expression in mice age-matched to those used in the in vitro pharmacology studies (Fig. 8B), and also evaluated whether the CCh response measured in juvenile mice in vitro was modified by extended periods of wakefulness in vivo prior to brain slice preparation (Figs 8C–H). As described in adult rodents (Gerashchenko et al. 2008; Pasumarthi et al. 2010; Morairty et al. 2013; Dittrich et al. 2015), we found that c-FOS/nNOS coexpression in young mice increased following a RS opportunity after a period of extended wakefulness. However, the proportion of c-FOS/nNOS coexpression was lower than in adults (18% vs. published reports of 60–80%), which may reflect the immature age at which these mice were studied. Juvenile mice respond to a 4 h homeostatic sleep challenge with increased sleep (sleep time and number of bouts) but there is considerable inter-individual variability in SWA following acute sleep deprivation until P42 (Nelson et al. 2013). Since we did not record SWA in the current study, it is possible that the lower c-FOS/nNOS expression in young mice may reflect this inter-individual variability. In juvenile brain slices prepared following 4 h SD, nNOS/NK1R neurons demonstrated responsiveness to CCh application that was similar to undisturbed mice. However, there was a change in glutamatergic tone onto these cells that may indicate network reorganization with prolonged wakefulness (Fig. 8G,H). Along with the absence of a diurnal variation of the CCh response (Fig. 9A), these results suggest that cholinergic modulation of cortical nNOS/NK1R cells is largely independent of sleep homeostasis (Kalinchuk et al. 2015) and age (Fig. S2).

In summary (Fig. 9C), our results demonstrate that BF neurons send projections to deep layer cortical nNOS/NK1R neurons, and that there is a cholinergic component to this connectivity. In addition, we show that cortical nNOS/NK1R neurons have a mixed response to cholinergic inputs, with excitation predominating. Notably, ACh mechanisms reduce glutamatergic input onto cortical nNOS/NK1R cells which, in turn, may prevent the NMDA-R dependent synaptic scaling of NO production previously found in neuronal cultures (Rameau et al. 2007). Under conditions of sleep deprivation, the increase in glutamatergic tone may downregulate nNOS production despite cholinergic responses remaining intact (Rameau et al. 2007).

Perspective

We hypothesize that a fine balance of BF cholinergic signaling, nNOS/NK1R neuron activity, and cortical synchronization involving other neurotransmitter systems orchestrate the regulation of sleep homeostasis (Jimenez-Capdeville et al. 1997). However, homeostatic sleep regulation is unlikely to be the exclusive function of the neural pathway from the BF cholinergic cells to cortical nNOS/NK1R neurons. To test this hypothesis, future studies will require in vivo characterization of the electrical activity of cortical nNOS/NK1R neurons relative to sleep/wake state and acetylcholine release to delineate the physiological relevance of this connection. Determination of whether the response of cortical nNOS/NK1R neurons to cholinergic stimulation is altered after a period of RS following extended wakefulness when these neurons show elevated c-FOS expression will also be of interest. Lastly, future efforts should evaluate GABAergic tone onto the cortical nNOS/NK1R

cells, which may be modified by cholinergic input and sleep deprivation. Such studies will be necessary to fully understand the network dynamics that govern cortical states and sleep homeostasis.

Supplementary Material

Supplementary data is available at *Cerebral Cortex* online.

Funding

This work was supported by the National Institutes of Health (grant numbers R01HL059658, R01NS077408, R21NS087550, R01NS082876, R21NS083639 and R21NS085757) and by the Agence Nationale de la Recherche (grant number ANR 2011 MALZ 003 01, BC and JP).

Notes

The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health. *Conflict of Interest:* None declared.

References

- Abreu-Villaca Y, Filgueiras CC, Manhaes AC. 2011. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res.* 221:367–378.
- Anacleot C, Pedersen NP, Ferrati LL, Venner A, Bass CE, Arrigoni E, Fuller PM. 2015. Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms. *Nat Commun.* 6:8744.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, et al. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 9:557–568.
- Borbély AA. 1982. A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol.* 1:195–204.
- Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW. 2012. Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev.* 92:1087–1187.
- Brown RE, McKenna JT. 2015. Turning a negative into a positive: ascending GABAergic control of cortical activation and arousal. *Front Neurol.* 6:135.
- Cabezas C, Irinopoulou T, Cauli B, Poncer JC. 2013. Molecular and functional characterization of GAD67-expressing, newborn granule cells in mouse dentate gyrus. *Front Neural Circuits.* 7:60.
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci.* 17:3894–3906.
- Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. 2004. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci.* 24:8940–8949.
- Chen L, Yin D, Wang TX, Guo W, Dong H, Xu Q, Luo YJ, Cherasse Y, Lazarus M, Qiu ZL, et al. 2016. Basal forebrain cholinergic neurons primarily contribute to inhibition of electroencephalogram delta activity, rather than inducing behavioral wakefulness in mice. *Neuropsychopharmacology.* 8:2133–2146.
- Crunelli V, Hughes SW. 2010. The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci.* 13:9–17.

- Dittrich L, Heiss JE, Warriar DR, Perez XA, Quik M, Kilduff TS. 2012. Cortical nNOS neurons co-express the NK1R receptor and are depolarized by Substance P in multiple mammalian species. *Front Neural Circuits*. 6:31.
- Dittrich L, Moriarty SR, Warriar DR, Kilduff TS. 2015. Homeostatic sleep pressure is the primary factor for activation of cortical nNOS/NK1R neurons. *Neuropsychopharmacology*. 40:632-639.
- Eckenstein FP, Baughman RW, Quinn J. 1988. An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 25:457-474.
- Eglen RM, Nahorski SR. 2000. The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype? *Br J Pharmacol*. 130:13-21.
- Fanselow EE, Richardson KA, Connors BW. 2008. Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *J Neurophysiol*. 100:2640-2652.
- Ferezou I, Hill EL, Cauli B, Gibelin N, Kaneko T, Rossier J, Lambolez B. 2007. Extensive overlap of mu-opioid and nicotinic sensitivity in cortical interneurons. *Cereb Cortex*. 17:1948-1957.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 2007. *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam: Elsevier.
- Gallopin T, Geoffroy H, Rossier J, Lambolez B. 2006. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb Cortex*. 16:1440-1452.
- Gerashchenko D, Wisor JP, Burns D, Reh RK, Shiromani PJ, Sakumi T, de la Iglesia HO, Kilduff TS. 2008. Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:10227-10232.
- Grillner P, Bonci A, Svensson TH, Bernardi G, Mercuri NB. 1999. Presynaptic muscarinic (M3) receptors reduce excitatory transmission in dopamine neurons of the rat mesencephalon. *Neuroscience*. 91:557-565.
- Gritti I, Manns ID, Mainville L, Jones BE. 2003. Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat. *J Comp Neurol*. 458:11-31.
- Gulledge AT, Park SB, Kawaguchi Y, Stuart GJ. 2007. Heterogeneity of phasic cholinergic signaling in neocortical neurons. *J Neurophysiol*. 97:2215-2229.
- Han Y, Shi YF, Xi W, Zhou R, Tan ZB, Wang H, Li XM, Chen Z, Feng G, Luo M, et al. 2014. Selective activation of cholinergic basal forebrain neurons induces immediate sleep-wake transitions. *Curr Biol*. 24:693-698.
- Henny P, Jones BE. 2008. Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *Eur J Neurosci*. 27:654-670.
- Higo S, Akashi K, Sakimura K, Tamamaki N. 2009. Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Front Neuroanat*. 3:25.
- Higo S, Udaka N, Tamamaki N. 2007. Long-range GABAergic projection neurons in the cat neocortex. *J Comp Neurol*. 503:421-431.
- Hill EL, Gallopin T, Ferezou I, Cauli B, Rossier J, Schweitzer P, Lambolez B. 2007. Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurophysiol*. 97:2580-2589.
- Hur EE, Zaborszky L. 2005. Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study [corrected]. *J Comp Neurol*. 483:351-373.
- Irmak SO, de Lecea L. 2014. Basal forebrain cholinergic modulation of sleep transitions. *Sleep*. 37:1941-1951.
- Jackman SL, Beneduce BM, Drew IR, Regehr WG. 2014. Achieving high-frequency optical control of synaptic transmission. *J Neurosci*. 34:7704-7714.
- Jasper HH, Tessier J. 1971. Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science*. 172:601-602.
- Jimenez-Capdeville ME, Dykes RW, Myasnikov AA. 1997. Differential control of cortical activity by the basal forebrain in rats: a role for both cholinergic and inhibitory influences. *J Comp Neurol*. 381:53-67.
- Kalinchuk AV, Porkka-Heiskanen T, McCarley RW, Basheer R. 2015. Cholinergic neurons of the basal forebrain mediate biochemical and electrophysiological mechanisms underlying sleep homeostasis. *Eur J Neurosci*. 41:182-195.
- Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B. 2009. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci*. 29:3642-3659.
- Kawaguchi Y. 1997. Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol*. 78:1743-1747.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1996. Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci*. 16:2701-2715.
- Kilduff TS, Cauli B, Gerashchenko D. 2011. Activation of cortical interneurons during sleep: an anatomical link to homeostatic sleep regulation? *Trends Neurosci*. 34:10-19.
- Kocharyan A, Fernandes P, Tong XK, Vaucher E, Hamel E. 2008. Specific subtypes of cortical GABA interneurons contribute to the neurovascular coupling response to basal forebrain stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28:221-231.
- Kubota Y, Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y. 2011. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex*. 21:1803-1817.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J. 1992. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron*. 9:247-258.
- Lape R, Nistri A. 2000. Current and voltage clamp studies of the spike medium afterhyperpolarization of hypoglossal motoneurons in a rat brain stem slice preparation. *J Neurophysiol*. 83:2987-2995.
- Leao RN, Mikulovic S, Leao KE, Munguba H, Gezelius H, Enjin A, Patra K, Eriksson A, Loew LM, Tort AB, et al. 2012. OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci*. 15:1524-1530.
- Lee JE, Jeon CJ. 2005. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-containing neurons in mouse and rabbit visual cortex and co-localization with calcium-binding proteins. *Mol Cells*. 19:408-417.
- Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE. 2005. Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci*. 25:4365-4369.
- Li F, Endo T, Isa T. 2004. Presynaptic muscarinic acetylcholine receptors suppress GABAergic synaptic transmission in the intermediate grey layer of mouse superior colliculus. *Eur J Neurosci*. 20:2079-2088.
- Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fa M, Giagheddu M, Imperato A, Gessa GL. 1995. Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res*. 671:329-332.

- Matthews EA, Linardakis JM, Disterhoft JF. 2009. The fast and slow afterhyperpolarizations are differentially modulated in hippocampal neurons by aging and learning. *J Neurosci*. 29: 4750–4755.
- Metherate R, Ashe JH. 1993. Ionic flux contributions to neocortical slow waves and nucleus basalis-mediated activation: whole-cell recordings in vivo. *J Neurosci*. 13:5312–5323.
- Metherate R, Cox CL, Ashe JH. 1992. Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *J Neurosci*. 12: 4701–4711.
- Morairty SR, Dittrich L, Pasumarthi RK, Valladao D, Heiss JE, Gerashchenko D, Kilduff TS. 2013. A role for cortical nNOS/NK1R neurons in coupling homeostatic sleep drive to EEG slow wave activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110: 20272–20277.
- Munoz W, Tremblay R, Levenstein D, Rudy B. 2017. Layer-specific modulation of neocortical dendritic inhibition during active wakefulness. *Science*. 355:954–959.
- Nelson AB, Faraguna U, Zoltan JT, Tononi G, Cirelli C. 2013. Sleep patterns and homeostatic mechanisms in adolescent mice. *Brain Sci*. 3:318–343.
- Pasumarthi RK, Gerashchenko D, Kilduff TS. 2010. Further characterization of sleep-active neuronal nitric oxide synthase neurons in the mouse brain. *Neuroscience*. 169:149–157.
- Perrenoud Q, Geoffroy H, Gauthier B, Rancillac A, Alfonsi F, Kessar N, Rossier J, Vitalis T, Gallopin T. 2012. Characterization of Type I and Type II nNOS-expressing interneurons in the barrel cortex of mouse. *Front Neural Circuits*. 6:36.
- Perrenoud Q, Rossier J, Geoffroy H, Vitalis T, Gallopin T. 2013. Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cereb Cortex*. 23:423–441.
- Perry S, Gezelius H, Larhammar M, Hilscher MM, Lamotte d'Incamps B, Leao KE, Kullander K. 2015. Firing properties of Renshaw cells defined by Chma2 are modulated by hyperpolarizing and small conductance ion currents Ih and ISK. *Eur J Neurosci*. 41:889–900.
- Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E. 1999. Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci*. 19:5228–5235.
- Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, Titcombe RF, Misra C, Khatri L, Getzoff ED, Ziff EB. 2007. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci*. 27:3445–3455.
- Semba K. 1991. The cholinergic basal forebrain: a critical role in cortical arousal. *Adv Exp Med Biol*. 295:197–218.
- Shen KZ, Johnson SW. 2000. Presynaptic dopamine D2 and muscarinic M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *J Physiol*. 525(Pt 2):331–341.
- Shute CC, Lewis PR. 1967. The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain*. 90:497–520.
- Smiley JF, McGinnis JP, Javitt DC. 2000. Nitric oxide synthase interneurons in the monkey cerebral cortex are subsets of the somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin cells. *Brain Res*. 863:205–212.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*. 262: 679–685.
- Thiele A. 2013. Muscarinic signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 36:271–294.
- Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, Obata K, Kaneko T, Tamamaki N. 2005. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci*. 21:1587–1600.
- Tomioka R, Rockland KS. 2007. Long-distance corticocortical GABAergic neurons in the adult monkey white and gray matter. *J Comp Neurol*. 505:526–538.
- Tricoire L, Vitalis T. 2012. Neuronal nitric oxide synthase expressing neurons: a journey from birth to neuronal circuits. *Front Neural Circuits*. 6:82.
- Vaucher E, Linville D, Hamel E. 1997. Cholinergic basal forebrain projections to nitric oxide synthase-containing neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 79:827–836.
- Vazquez J, Baghdoyan HA. 2001. Basal forebrain acetylcholine release during REM sleep is significantly greater than during waking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280: R598–R601.
- Wess J. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 44:423–450.
- Williams RH, Chee MJ, Kroeger D, Ferrari LL, Maratos-Flier E, Scammell TE, Arrigoni E. 2014. Optogenetic-mediated release of histamine reveals distal and autoregulatory mechanisms for controlling arousal. *J Neurosci*. 34: 6023–6029.
- Wong LA, Gallagher JP. 1989. A direct nicotinic receptor-mediated inhibition recorded intracellularly in vitro. *Nature*. 341:439–442.
- Yan XX, Garey LJ. 1997. Morphological diversity of nitric oxide synthesising neurons in mammalian cerebral cortex. *J Hirnforsch*. 38:165–172.

Annexe 2 :

Metabolic impairment of the astrocyte serine synthesis pathway contributes to the deficits of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease

Metabolic impairment of the astrocyte serine synthesis pathway contributes to the deficits of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease

Juliette Le Douce^{1,#}, Julien Veran^{2,#}, Emilie Faivre¹, Pierrick Jégo¹, Xavier Toussay³, Michel Vandenberghe¹, Yaël Balbastre¹, Marianne Maugard¹, Juliette Piquet³, Elvire Guiot³, Nguyet Thuy Tran⁴, Myriam Taverna⁴, Anne-Sophie Hérard¹, Thierry Delzescaux¹, Philippe Hantraye¹, Emmanuel Brouillet¹, Bruno Cauli³, Stéphane H.R. Olié^{2,*}, Aude Panatier^{2,*} and Gilles Bonvento^{1,*}

¹ *Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale (DRF), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), Molecular Imaging Center (MIRCent), CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France*

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

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

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

co first-authors

***CORRESPONDING AUTHORS:**

Gilles Bonvento, PhD
MIRCent and CNRS UMR 9199,
Fontenay-aux-Roses, France
Tel.: +33 14654 8330
Fax: +33 14654 9116
Email: gilles.bonvento@cea.fr

Aude Panatier, PhD
Neurocentre Magendie
Inserm U862
University of Bordeaux
Bordeaux, France
Email: aude.panatier@inserm.fr

ABSTRACT

Both cerebral glucose metabolism and synaptic activity are altered early in Alzheimer's disease (AD). Glucose, the main energy substrate of the brain, is differentially processed by neurons (oxidation) and astrocytes (glycolysis). Aside from ATP production, a major function of glycolysis is to provide precursors such as L-serine, to support macromolecular synthesis. In the brain, L-serine is only produced in astrocytes. It is generated from glucose by diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate into the phosphorylated pathway. L-serine is also the precursor of D-serine, the principal co-agonist of synaptic N-methyl D-aspartate receptors (NMDARs), required for synaptic activity and plasticity. We show that 3xTg-AD mice display early *in vivo* alterations of glucose metabolism and synaptic deficits in the CA1 region of the hippocampus. These functional deficits are associated with altered expression of Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH, the first enzyme of the pathway) and a reduced concentration of L-serine. Exogenous D-serine completely rescued synaptic plasticity in 3xTg-AD mice. Our data show that a deficit of L-serine synthesis by astrocytes may contribute to cognitive deficits in AD.

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disorder characterized by progressive memory decline and cognitive impairment. The underlying neuropathology includes brain deposition of amyloid plaques formed by misfolded amyloid- β (A β), neurofibrillary tangles, and synapse loss ^{1,2}.

The aggregation of the amyloid- β (A β) peptide and its subsequent accumulation in the brain are key initiating factors in AD, long before the onset of cognitive symptoms. Soluble A β oligomers play an essential pathogenic role in decreased spine density, impairment of synaptic plasticity, and neuronal loss ^{3, 4}. Long-term potentiation (LTP), one of the cellular mechanisms of memory storage, is impaired in AD or A β -exposed hippocampus, and this impairment is mostly dependent on N-methyl D-aspartate receptors (NMDARs) ⁵.

We have previously shown that the NMDAR co-agonist D-serine, a gliotransmitter released from astrocytes, is required for LTP ⁶. D-serine is generated from glucose through diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) into the phosphorylated pathway. The first committed step in this pathway is the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate by the specific astrocytic enzyme 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH) ⁷. PHGDH plays a critical role in generating D-serine ⁸, either directly in astrocytes or indirectly in neurons after import of astrocytic L-serine ⁹.

Decreased glucose metabolism occurs in specific brain regions during the pre-symptomatic period of AD ^{10, 11}. This reduction of cerebral glucose metabolism correlates with disease progression and even predicts the histopathological diagnosis in AD. However, it is still unclear whether, and how, glucose dysregulation contributes to synaptic defects in AD ¹². Recent observations suggest that the complex metabolic changes that occur early in AD may depend on astrocytes ¹³. Glucose entering into both neurons and astrocytes, via facilitated transport across the blood brain barrier, represents an important source of energy for the brain. Reduced glucose transporter 1 (GLUT1) expression in endothelial cells worsens cerebrovascular degeneration, neuropathology and cognitive function in an AD mouse model ¹⁴. This shortage of glucose may directly reduce the availability of ATP required to sustain synaptic transmission but could also decrease the production of L-serine, the precursor of D-serine.

We investigated whether a metabolically-driven defective astrocytic phosphorylated pathway contributes to early synaptic deficits in a mouse model of AD. We found that glucose metabolism and L-serine production in astrocytes are impaired along with long-term synaptic plasticity (LTP and LTD) in the CA1 region of 3xTg-AD mice. Exogenous D-serine completely rescued both forms of synaptic plasticity in these mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experimental procedures using animals were performed in strict accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130) and conformed to the ethical guidelines of both the European Economic Community (86/609/EEC) and the French National Charter on the ethics of animal experimentation. They were approved by a local ethics committee and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approval 14-015). The animal facility is accredited by the French authorities (B9-032-02). We used homozygous 3xTg-AD mice generated and maintained on a mixed J29/C57BL6 background (MMRRC #034830). 3xTg-AD mice express the mutated gene PS1M146V (knock-in) and the mutated human genes APPSwe and tauP301L in the same locus, both under the control of the mouse Thy1.2 regulatory element¹⁵. We also used age-matched NonTg control mice on the same background strain (129J /C57BL6).

In Vivo [14C]-2-Deoxyglucose Uptake

We measured [14C]-2-Deoxyglucose (2-DG) uptake in four experimental groups: 6-month-old female 3xTg-AD mice (n = 10), 6-month-old female WT mice (n = 9), 12-month-old female 3xTg-AD mice (n = 10) and 12-month-old female WT mice (n = 10). Experiments were performed in conscious, lightly restrained animals that were previously habituated to the constraint. Animals fasted for 12 h before the experiment but had free access to water. On the day of the experiment, the mice were anesthetized with isoflurane (2% in O₂) and two catheters were inserted into the femoral artery and vein, respectively. Body temperature was maintained at 37 °C. The mice were allowed to recover

from anesthesia for 1 h and were intravenously injected with [¹⁴C]-2DG (16.5 mCi/100 g body weight; Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Glycemia was measured using DIGL-100 QuantiChrom™ Glucose Assay Kit. The mice were euthanized by injection of a lethal dose of sodium pentobarbital 45 min after injection. The brains were rapidly removed and immediately frozen at -40 °C in isopentane. They were cut into 20 μm-thick coronal sections with a CM3050S cryostat (Leica, Rueil-Malmaison, France). Every other section was mounted on a coverslip, rapidly heat-dried, and placed against autoradiographic film (Kodak Biomax MR) for 10 days together with radioactive [¹⁴C] standards (146C, American Radiochemical Company, St Louis, MO, USA). The sections not used for the autoradiography study were mounted on Superfrost glass slides that were then processed for Nissl staining, to obtain additional information about brain anatomy.

Postmortem Image Registration, Three-Dimensional Reconstruction and Analysis

Autoradiographic and Nissl-stained sections were digitized using a high-resolution flatbed scanner (ImageScanner III; GE Healthcare Europe, Orsay, France) at 600 dpi (pixel size 42 x 42 μm²) and 1,200 dpi (pixel size 21 x 21 μm²) in-plane resolution, respectively. Image processing was performed using our in-house software platform BrainVISA (<http://brainvisa.info/>). Each anatomic volume was first reconstructed in 3D, and each autoradiographic volume was reconstructed in 3D using the corresponding anatomic volume as a geometrical reference for co-registration¹⁶. Autoradiographic images were converted from gray scale to activity (nCi/g) using the [¹⁴C] standards and normalized at 200 nCi/g. A brain template was created using all the anatomic brain volumes at a final resolution of 0.05 x 0.05 x 0.1 mm³. Regional differences in cerebral glucose uptake between 3xTg-AD and WT mice were then assessed using a voxel-wise two-tailed unpaired t-test implemented in BrainVISA¹⁷.

FRET imaging of brain slices

Injections of AAVs in mice

The plasmid encoding the sensor Laconic¹⁸ was obtained from Addgene (www.addgene.org). We generated an adeno-associated viral vector (AAV9) expressing Laconic under the control of the short

gfaABC1D promoter. The design, production, and titration of the AAV9 vector have been described previously¹⁹. The AAV was diluted to obtain a final titer of 5.10^{12} VG/ml. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (150 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Lidocaine (5 mg/kg) was injected subcutaneously under the scalp 5 min before the beginning of surgery. The mice received bilateral stereotaxic injections of AAVs administered by a 10 μ l Hamilton syringe via a 34 gauge blunt needle. The stereotaxic coordinates used were as follows: AP - 2 mm; L +/- 2 mm; V -1.2 mm with the tooth bar set at 0. Mice received a total volume of 2 μ l per injection site at a rate of 0.2 μ l/min. At the end of the injection, the needle was left in place for 5 min before being slowly removed. The skin was sutured, and the mice were allowed to recover for 4-6 weeks.

Slice Preparation

The mice were deeply anesthetized with Ketamine/Xylazine. Heparin (1000 U) was directly injected in the left heart ventricle to prevent blood coagulation, and the mice were perfused transcardially with oxygenated ice-cold sucrose artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 2.5 mM glucose, 25 mM sucrose, and 3 mM kynurenic acid (Sigma) as previously described²⁰. The brains were quickly removed and sagittal slices (300 μ m thick) containing the hippocampus were cut with a vibratome (VT1000S; Leica). Slices were allowed to recover ten minutes at 37 °C in oxygenated sucrose ACSF and then placed at room temperature for one hour in ACSF saturated with O₂/CO₂ (95%/5%) containing 2.5 mM glucose and 22.5 mM sucrose. The slices were transferred to a submerged recording chamber and perfused with oxygenated ACSF lacking kynurenic acid.

Fluorescence imaging

Two-photon images were obtained with a custom-built 2-photon laser scanning microscope based on an Olympus BX51WI upright microscope (Olympus) with a 40X (0.8 NA) water-immersion objective and a titanium:sapphire laser (MaiTai HP; SpectraPhysics) tuned at 850 nm for mTFP excitation. Galvanometric scanners (model 6210; Cambridge Technology) were used for scanning, and a piezo-

driven objective scanner (P-721 PIFOC; Physik Instrumente GmbH) was used for z-stack image acquisition. A two-photon emission filter was used to reject residual excitation light (E700 SP; Chroma Technology). A fluorescence cube containing 479/40 and 542/50 emission filters and a 506 nm dichroic beam splitter (FF01-479/40, FF01-542/50 and FF506-Di02-25x36 Brightline Filters; Semrock) was used for the separation of the mTFP and Venus signals. Two imaging channels (H9305 photomultipliers; Hamamatsu) were used for simultaneous detection of the two types of fluorescence emission. An image stack of 10-20 images with a 1 μm interval was acquired every 30 seconds. Occasional x, y, and z drifts were corrected using custom macros developed from ImageJ plugins TurboReg, StackReg, MultiStackReg and Image CorrelationJ. mTFP and Venus fluorescence intensities were measured at the soma of astrocytes. Fluorescence intensities of regions of interest (ROIs) were calculated for each time point from average intensity projections of 3–5 frames by averaging pixel intensity. Fluorescence ratios were calculated by dividing the mean mTFP intensity of a given ROI by the mean Venus intensity of the same ROI. Variations of fluorescence ratio were expressed as the ratio R/R_0 where R corresponds to the fluorescence ratio in the ROI at a given time point, and R_0 corresponds to the mean fluorescence ratio in the same ROI during the 10 min control baseline prior to the application of drugs. Cells exhibiting a baseline with a slope smaller than $0.5\%.\text{min}^{-1}$ were considered to be stable and further studied.

Immunofluorescence

Mice were euthanized by an overdose of pentobarbital and perfused transcardially with 100 ml of cold 4% paraformaldehyde (PFA) solution in phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.4). The brains were cryoprotected in a 30% sucrose solution in PB for 24 h. Sagittal and coronal brain sections (35 μm) were cut on a freezing microtome, serially collected, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The slices were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma) and blocked with 4.5% normal goat serum (Sigma) for 30 min and were incubated overnight at room temperature (RT) with the following primary antibodies: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:1000, rabbit; Dako), PHGDH (1:500, guinea pig; Frontier Institute), NeuN (1:500, mouse; Chemicon) or IBA1 (1:1000, rabbit; Dako). After

rinsing, the brain slices were incubated for 3 h at RT with fluorescent secondary 488 and 594 Alexa Fluor-conjugated antibodies (Invitrogen) and mounted with FluorSave reagent (Calbiochem).

Immunohistochemistry

Brain slices were pretreated in 0.3% H₂O₂, blocked in 4.5% NGS (Sigma), and incubated with the following primary antibodies: 4G8 (1:1000, mouse; Signet Covance), AT8 (1:400, mouse; ThermoScientific), OC (1:500, rabbit, Millipore), AT180 (1:1000, mouse, ThermoScientific), and HT7 (1:500, mouse, Innogenetics) for 48 h at 4 °C. After rinsing, the brain slices were incubated with biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories) for 1 h at RT. Finally, they were incubated with the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) and revealed with the DAB kit (Vector Laboratories). Antigen retrieval with formic acid (70% for 2 min) was performed for 4G8 antibody.

Image analysis

Images were acquired using confocal microscopy (Leica SP8) and were analyzed using Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>). Analysis of the astrocyte ramification and the corresponding immunofluorescence staining was performed from stacked confocal images (13 steps; z-step 1 μm, maximum intensity stack) acquired with the 40X objective, zoom 2 (pixel size of 0.284 x 0.284 μm²). The image stacks of GFAP staining were reconstructed as binarized representations and the Sholl method of concentric circles²¹ was used to determine astrocyte ramification. Each cell was manually outlined to exclude adjacent cells by tracing a region of interest (ROI) and was analyzed by selecting the center of its soma and then running the Sholl analysis procedure, which counts the number of intersections at circles of increasing radii (1 μm increased radius between each ring) from the center. The ROI was then applied on the image stacks of PHGDH staining to measure the mean grey value of each analyzed astrocyte. The maximal ring with an intersecting process (max distance), the sum of the number of intersections (branching complexity) for all circles, and the ramification index were calculated for each cell and compared among groups to the corresponding mean grey value of PHGDH staining.

Immunoblotting

Mice were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital. The brains were rapidly collected and sliced into 1-mm thick coronal sections with a brain matrix and the hippocampus was dissected out. The samples were then homogenized using a sonicator (cycle 0.5, amplification 30%, 6 strokes) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1% SDS, with protease (Roche) and phosphatase (Sigma) inhibitor cocktails. The protein concentration was determined using the BCA method. Protein samples were diluted in NuPAGE LDS sample buffer with NuPAGE Sample Reducing agent (Life Technologies), boiled for 10 min, loaded on a 4–12% Bis-Tris gel, separated, and transferred to a nitrocellulose membrane, using an iBlot transfer device (Life Technologies). The membranes were blocked in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, 5% milk for 30 min at RT and then incubated overnight at 4 °C with antibodies against PHGDH (1:500), SRR (1:1000), and Actin (1:5000, rabbit; Sigma) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and 5% milk. After rinsing, secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were incubated with the membrane for 1 h. Antibody binding was detected using a Fusion FX7 camera system (ThermoScientific) after incubation with the enhanced chemiluminescence Clarity substrate (Bio-Rad). Band intensity was measured using BioID software and normalized to actin expression.

RNA extraction and RT-qPCR

Mice were euthanized under pentobarbital anesthesia. Brains were rapidly collected, and the hippocampus were dissected out and separated on ice from 1 mm thick coronal slices obtained using a mouse brain matrix. Total RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen). Reverse transcription (RT) was performed with 350 ng of total RNA using Superscript II VIL0 reverse transcriptase (Invitrogen) followed by treatment with RNase H. Complementary DNA (7ng) was processed for RT-qPCR on a Mastercycler ep realplex machine (Eppendorf). PCR products were quantified by measuring the incorporation of SYBR green fluorescent dye (Master Mix, Roche). The primers used were as follows: *phgdh* 5'-AAGTTCATGGGGACAGAGCTGAAC-3' (forward) and 5'-CCTTCACCATGTCCACAACTGGA-3' (reverse); *cyclophilin A* 5'-ATGGCAAATGCTGGACCAAA-

3' (forward) and 5'-GCCTTCTTTACCTTCCCAAA-3' (reverse). The relative expression of *phgdh* was assessed using the $\Delta\Delta C_t$ calculation.

Microdialysis

Extracellular levels of L-serine were measured *in vivo* using microdialysis. Control and 3xTg-AD mice were anesthetized with medetomidine (Domitor) 0.5 mg/kg and benzodiazepine (Midazolam) 5 mg/kg and placed in a stereotaxic frame. The body temperature was stabilized at 37 °C throughout the experiment with a thermostatic blanket. A microdialysis probe (CMA 7, 2 mm, cutoff 6 kDa; CMA Microdialysis) was implanted in the CA1 region of the hippocampus (coordinates: AP, -2 mm; L, 1.4 mm from bregma; V, 1.3 mm from dura). Probes were perfused with ACSF (147 mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, and 0.85 mM MgCl₂) at a rate of 2 μ l/min. Mice recovered from probe insertion for 30 min and then microdialysates were collected every 20 min and frozen at -80°C until analysis.

Determination of L- and D-serine using chiral Capillary Electrophoresis coupled to Laser-Induced Fluorescence (CE-LIF)

Ten μ L of sample were mixed with 37.5 μ L derivatization buffer containing 10 mM borate pH 10, 5 μ M cysteic acid as internal standard and 6 μ L of a solution of 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) at 5 mg/mL in ethanol. The mixture was heated at 65 °C for 30 min and the samples kept at 7 ± 2 °C in the CE autosampler until analysis. Quantitative analysis of L- and D-serine was performed using Capillary Electrophoresis coupled to Laser-induced Fluorescence detection as previously described²². Capillary electrophoresis experiments were carried out using a PA800 plus Pharmaceutical Analysis System instrument (Sciex, formerly Beckman Coulter, Redwood City, CA, USA). The instrument was coupled with LIF detection equipped with a 3.5 mW argon-ion laser. Excitation and emission wavelengths were 488 and 520 nm, respectively. Data acquisition and instrument control were carried out using 32 KaratTM system software version 7.0 (Sciex). Electrophoretic conditions were: 175 mM borate buffer pH 10.25 and 12.5 mM β -cyclodextrin. Separation was performed in a 50 cm x 75 μ m Id silica capillary at -21 kV at 25 °C.

Electrophysiology

Slice Preparation

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

Field Recordings

For electrophysiological recordings, the slices were transferred into a recording chamber continuously perfused with ACSF (3 ml/min). A cut between CA3 and CA1 was made to avoid epileptiform activity, due to the presence of picrotoxin (100 μM) added to the ACSF just before recording. CA3-CA1 areas were identified with differential interference contrast microscopy (Olympus BX50). Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded with a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments, Inc.) using pipettes (3.5-5 MΩ) filled with ACSF and placed in the stratum radiatum of the CA1 area, close to the subiculum. NMDA fEPSPs were isolated with low Mg²⁺ ACSF (0.2 mM) with picrotoxin (100 μM) and 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[f]quinoxaline-2,3-dione (NBQX) (10 μM) to block GABA_A and AMPA/kainate receptors, respectively. Synaptic events were evoked at 0.5 Hz by orthodromic stimulation (100 μs) of Schaffer collaterals using a glass pipette, filled with ACSF, and placed in the stratum radiatum > 200 μm away from the recording electrodes. LTP was induced by applying a high-frequency stimulation (HFS) protocol (100 Hz train of stimuli for 1 s, repeated four times at 20 s intervals) performed in current clamp mode. LTD was induced with a 1 Hz train of stimuli applied for 30 minutes. Signals were filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz via a DigiData 1322 interface (Axon Instruments, Inc.). Data

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

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm SEM. A p-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed using Statistica software. For comparison between two groups, the Student's t-test was used. For multiple comparisons, a one-way ANOVA followed by Fisher's protected least-significant difference post hoc test was used. The frequency distributions were compared using a Chi² test. Electrophysiological data were compared using Mann Whitney or Wilcoxon tests.

RESULTS

We first performed an anatomopathological analysis of our colony of 3xTg-AD mice by focusing on hippocampal formation. We found that A β pathology develops earlier than the tau pathology but with a delayed time course relative to that reported in the original publication¹⁵. Intraneuronal A β was already present in six month-old 3xTg-AD mice, whereas oligomers and extracellular plaques were only detected in the subiculum and not in the CA1 region of the hippocampus of 12 month-old 3xTg-AD mice (Figure 1a). Using different anti-Tau antibodies, we found that Tau was hyperphosphorylated at multiple residues in an age-related manner (Figure 1b). We found that the pathology was considerably more pronounced in female mice than in age-matched males (Figure 1c), as previously observed by others^{23, 24}. We therefore only used female 3xTg-AD mice at 6-7 months and at 11-12 months of age.

Reactive astrocytes are classically associated with neuroinflammation and brain diseases, overexpress GFAP, and display morphological changes²⁵. We did not detect any change in GFAP expression at both 6 and 12 months of age by immunohistochemistry (Figure 2a) in the CA1 region. We used Sholl analysis to analyze individual GFAP-expressing astrocytes (Figure 2b) and found that

both the complexity (Figure 2c) and the surface (Figure 2d) of 3xTg-AD astrocytes were not statistically different from those of control astrocytes at the two time-points studied. Similarly, no prominent reactivity of microglia was observed using IBA1 as a morphological marker (Figure 2a). Altogether, these data indicate that six month-old 3xTg-AD mice do not exhibit A β plaques, overt astrocyte reactivity or neuroinflammation in the CA1 region, an age at which they already present synaptic and cognitive symptoms^{15, 26}.

A reduction in glucose use has already occurred by the time an AD patient first experiences clinical symptoms of dementia. We next assessed whether six month-old female 3xTg-AD mice already manifest glucose metabolism alterations.

3xTg-AD mice display alterations of glucose metabolism *in vivo*

We performed an *in vivo* 3D autoradiographic measurement of glucose uptake including voxel-wise statistical analysis to map the differences in cerebral metabolism between WT and 3xTg-AD mice at two time-points. This approach allows the statistically significant unbiased identification of metabolic differences between groups at the voxel level without operator-dependent delineation of regions of interest²⁷ as widely employed for human studies using Statistical Parametric Mapping (SPM). We found that six month-old 3xTg-AD mice displayed localized increases in glucose uptake in the striatum, the auditory cortex, and the retrosplenial cortex. Decreases in glucose uptake were observed in the amygdala, the entorhinal cortex and the hippocampus (Figure 3a). Older 3xTg-AD mice displayed the same hypermetabolic clusters but had more hypometabolic clusters, in particular in the hippocampus (Figure 3b). Within the hippocampus, glucose uptake was significantly decreased by 10 to 15% in the CA1, Dentate Gyrus, and CA2. These results indicate that 3xTg-AD mice display localized metabolic changes reminiscent of what is observed in AD patients. In the brain, glucose is mainly transported into astrocytes and processed via aerobic glycolysis²⁸. We next investigated whether the metabolic status of astrocytes was altered in 3xTg-AD mice.

Alteration of glucose metabolism in astrocytes of 3xTg-AD mice

Resting astrocytes tonically produce lactate via aerobic glycolysis²⁹. We monitored astrocyte lactate dynamics in hippocampal slices in real time using Laconic, a FRET lactate nanosensor. Lactate transport across the astrocytic plasma membrane is mediated by monocarboxylate transporters (MCTs). We therefore used AR-C155858, a MCT blocker³⁰, to measure the accumulation of lactate in single astrocytes under physiological extracellular glucose concentration³¹. We found that MCT blockade does not lead to further intracellular lactate accumulation in astrocytes of 3xTg-AD relative to control mice (Figure 4a-c). This result indicates that the glycolytic flux of 3xTg-AD astrocytes is altered. We next investigated whether the production of L-serine was affected in 3xTg-AD mice.

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

L-serine is only synthesized in astrocytes through diversion of the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) into the phosphorylated pathway. The first committed step in this pathway is the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate by the specific astrocytic enzyme 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH). Using specific antibodies and confocal microscopy performed on a control mouse brain, we first confirmed that PHGDH was almost exclusively expressed by GFAP-expressing astrocytes and by few microglial cells in CA1 (Figure 5a). Expression of PHGDH was also restricted to astrocytes in the non-human primate brain (Figure 5b). Using RT-qPCR, we found that the level of PHGDH expression was significantly lower in 3xTg-AD mice compared to control mice. We did not observe any significant change in the protein level of PHGDH between control and 3xTg-AD mice by immunoblotting (Figure 5c). We took advantage of the Sholl analysis performed on individual astrocytes to determine whether the expression of PHGDH was locally altered in the CA1 region of 3xTg-AD mice. We found that the distribution of PHGDH expression was significantly different between control and 3xTg-AD mice when the level of PHGDH immunofluorescence was calculated on individual astrocytes selected from GFAP stack images (Figure 5d, e). These alterations of astrocytic glycolysis and PHGDH expression translated into significant functional changes. Indeed, *in vivo* microdialysis measures of L-serine showed that the concentration of extracellular L-serine was significantly lower in 3xTg-AD mice (Figure 5f). These

results support the hypothesis of a defective (probably metabolically-driven) astrocytic phosphorylated pathway.

L-serine generates D-serine, an important signaling molecule, via the serine racemase (SRR). Using RT-qPCR and immunoblotting, we found that both SRR mRNA and protein levels were not significantly different between 3xTg-AD and control mice (data not shown).

Synaptic deficits in the CA1 region of 3xTg-AD mice

We observed that basal glutamatergic transmission was altered in the hippocampus of 6-7 month old female 3xTg-AD mice as originally reported¹⁵. We also found that the input/output relationship for evoked fEPSPs at CA3-CA1 synapses was shifted to the right, indicating that the efficacy of the glutamatergic transmission was reduced (n = 8 in WT and n = 11 in 3xTg-AD mice; Figure 6a, b). We next assessed activity-dependent plasticity and observed that high-frequency stimulation (HFS)-induced LTP was impaired in these animals ($156.7\% \pm 6.7$ in WT vs $123.5\% \pm 5.4$ in 3xTg-AD, $p = 0.028$; Figure 6c). Similarly, low-frequency stimulation (LFS)-induced LTD was also reduced in 3xTg-AD mice ($79.9\% \pm 9.5$, n = 8 in WT vs 114.5 ± 6.6 , n = 9 in 3xTg-AD, $p = 0.008$; Figure 6d). Therefore, 3xTg-AD mice display deficits in synaptic transmission and plasticity at CA3-CA1 synapses that are associated with intracellular A β immunoreactivity before the appearance of extracellular A β deposition and tangles.

Restoration of synaptic plasticity by D-serine

Our data suggest an impairment of L-serine metabolism in 3xTg-AD mice. The availability of L-serine synthesized via the phosphorylated pathway in brain is a key determinant for normal NMDA receptor function, which depends on D-serine being maintained within a certain concentration range⁸. D-serine is an endogenous co-agonist of synaptic NMDA receptors in many brain structures including the hippocampus^{6, 32}. As such, it plays a crucial role in NMDA-dependent plasticity⁶. Considering the role played by D-serine in NMDAR activation, we next tested whether impairments in hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity in female 3xTg-AD mice could be related

to a deficit in synaptic D-serine. We recorded the NMDAR component of field excitatory post-synaptic potentials (NMDAR-fEPSPs) that was isolated by reducing extracellular Mg^{2+} to relieve the voltage-dependent inhibition of NMDAR and by blocking GABA_A and AMPA/kainate receptors with picrotoxin (100 μ M) and NBQX (10 μ M), respectively. In control mice, bath application of D-serine (50 μ M) induced an increase of NMDA-fEPSPs ($123.9\% \pm 5.6$, $n=10$, $p=0.002$; Figure 7a). This is in agreement with previous work³² indicating that the level of occupancy of the co-agonist binding sites of synaptic NMDARs in this region was not fully saturated. Importantly, the D-serine-mediated increase in synaptic NMDAR-fEPSPs was bigger in 3xTg-AD mice ($151.2\% \pm 8.3$, $p=0.0078$, $n=8$; Figure 7a) showing that the level of occupancy of the glycine-binding site of NMDAR was significantly lower in 3xTg-AD mice ($p=0.0085$). Such results could explain the deficit in LTP and LTD observed in 3xTg-AD mice since less NMDAR would be available for activation during HFS and LFS. In agreement with this hypothesis, we were able to completely rescue LTP by supplying exogenous D-serine (50 μ M) in slices obtained from 3xTg-AD mice ($163.6\% \pm 9.7$, $n = 6$ in WT vs. $166.1\% \pm 12.4$, $n = 10$ in 3xTg-AD; $p=0.2635$, Figure 7b). Similarly, exogenous D-serine (50 μ M) completely rescued LTD in 3xTg-AD mice ($79.13 \pm 11.3\%$, $n = 5$ in WT vs $87.5\% \pm 4.9$ in 3xTg-AD; $p=0.6993$, Figure 7c).

DISCUSSION

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

Using electrophysiological as well as 3D analysis of *in vivo* brain glucose metabolism and histopathology, we observed that 3xTg-AD mice display synaptic dysfunction (in the CA1 region) and metabolic impairment (in specific brain regions including the hippocampal formation) prior to amyloid deposition, inflammation, or astrocyte reactivity.

Early alterations of cerebral metabolism, as measured using fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) and positron emission tomography (PET), are well established in AD and several studies have shown that abnormalities in FDG-PET can even predict progression from mild cognitive impairment (MCI) to AD (for references see ¹¹). There is no clear spatial correlation between the retention of Pittsburgh Compound-B (PiB, an *in vivo* amyloid imaging agent) and the uptake of FDG in the cortex of AD patients, supporting the hypothesis that amyloid deposition is not the main determinant of glucose changes. Such metabolic alterations have also been reported in many rodent models of AD including APP, APP/PS1, and 3xTg-AD mice ^{27, 33, 34}. As we observed in this study, decreases in glucose use were also reported in young transgenic APP mice that do not have amyloid plaques ³³. The fact that topical application of A β reduces glucose use in normal mice ³⁵ provides further evidence that A β produces alterations in energy metabolism that are independent of neuropathological changes. Recent data suggest that the endothelial glucose transporter 1 (GLUT1) may represent a molecular target by which A β could exert its deleterious metabolic effects ¹⁴. In the brain, there exists a metabolic complementarity between astrocytes and neurons. Glucose, the almost exclusive energy substrate of the brain, is glycolytically processed to produce lactate and pyruvate in astrocytes, whereas neurons predominantly process glucose through the pentose phosphate pathway to produce NADPH (for review, see ²⁸). As a consequence, the decreased glucose uptake we observed in 3xTg-AD mice was translated into a decreased glycolytic flux into astrocytes.

One major function of aerobic glycolysis is to maintain high levels of glycolytic intermediates to support anabolic reactions in cells ³⁶. Glycolytic intermediates are direct precursors for the biosynthesis of some nonessential amino acids since 3-phosphoglycerate (3PG) provides the carbons for glycine and serine. In the adult brain, these reactions (known as the phosphorylated pathway) occur only in astrocytes ⁸. This is an essential pathway as homozygous mutations of each of the three enzymes responsible for L-serine synthesis (PHGDH, PSAT1 and PSPH) are the cause of a syndrome called Neu-Laxova, a rare autosomal-recessive disorder characterized by severe

peripheral and central nervous system malformations (microcephaly) leading to prenatal or early postnatal death³⁷. We found that the concentration of extracellular L-serine was significantly reduced in 3xTg-AD mice. It is possible that the observed decrease of L-serine was due to the decreased availability of 3PG to fuel the phosphorylated pathway because the expression of PHGDH, the first enzyme of this pathway responsible for the oxidation of 3PG to 3-phosphohydroxypyruvate, was only moderately altered. L-serine is the main substrate for D-serine synthesis in the brain. We have previously shown that D-serine is an endogenous co-agonist of synaptic NMDA receptors³² that plays a crucial role in NMDA-dependent plasticity⁶. We tested the hypothesis that this defective astrocytic phosphorylated pathway contributes to early synaptic deficits in 3xTg-AD mice.

We observed that the alteration of both basal glutamatergic transmission and LTP precedes plaque deposition in the CA1 region of 3xTg-AD mice, as reported previously in 3xTg-AD and other transgenic mouse models of AD (¹⁵ and see ³⁸ for references). We found that not only the LTP but also the LTD was significantly impaired in seven month-old 3xTg-AD mice. These synaptic deficits were not yet observed in 1-2 month-old 3xTg-AD mice¹⁵ because of compensatory mechanisms involving endoplasmic reticulum (ER) calcium release^{39, 40}. We found that exogenous D-serine (50 μ M) completely rescued both forms of synaptic plasticity (LTP and LTD) in seven month-old female 3xTg-AD mice. These data support the hypothesis that a deficit of L-serine synthesis by astrocytes is responsible for the synaptic alteration mediated by NMDAR in the hippocampus of 3xTg-AD mice. In addition to lactate^{41, 42}, our data suggest that the altered production of another byproduct of aerobic glycolysis (D-serine) may play an important role in the pathophysiology of AD (and perhaps other neurodegenerative diseases). Recent data have shown that protein levels of PHGDH and PSAT1 (phosphoserine aminotransferase, the second enzyme of the phosphorylated pathway) are both increased in the hippocampus of early AD patients⁴³. These changes may reflect a compensatory mechanism of the serine biosynthesis pathway in astrocytes early in the course of the disease.

FUNDING

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011-34 MALZ-003-02 to G.B. and B.C.), Association France Alzheimer and Fondation de France (Prix

Spécial 2012 to G.B., B.C. and S.H.R.O.) and Infrastructure de Recherche translationnelle pour les Biothérapies en Neurosciences-NeurATRIS (G.B.). J.L.D. is a recipient of a PhD fellowship from the CEA (IRTELIS program). The team of G.B. is part of the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP) training network.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mylène Guérif, Martine Guillermier and Sueva Bernier for useful technical help and Dr. Felipe Barros for helpful discussion on FRET imaging. We thank Marie-Claude Gaillard for valuable inputs on molecular cloning, Noëlle Dufour, Charlène Joséphine and Dr. Alexis Bémelmans for viral production.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L.D. performed the confocal analysis, carried out the biochemical, RT-qPCR and the metabolic studies and developed the AAV with the help of M.M.

J.V. performed the electrophysiology with the help of A.P.

E.F. performed the histological analysis of the 3xTg-AD colony and performed the metabolic study with the help of G.B.

P.J. carried out the microdialysis study and the CE-LIF experiment with the help of T.T. and M.T.

X.T. carried out the FRET imaging experiments with the help of J.P., E.G and B.C.

M.V., Y. B., A-S. H. and T.D. performed the image analysis

P.H. and E.B. provided materials and discussed the data

B.C., S.H.R.O., A.P. and G.B. designed the study, analyzed data and wrote the manuscript.

B.C., S.H.R.O. and G.B. obtained funding for the research.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS

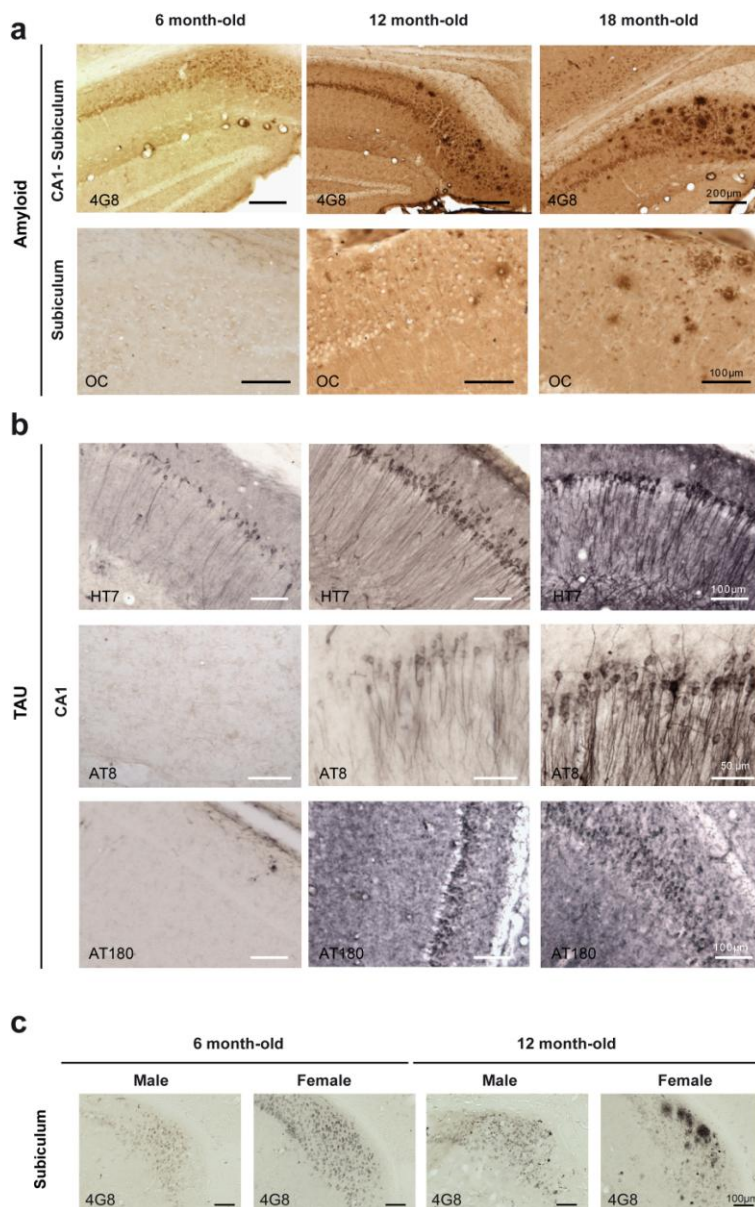


Figure 1. Anatomopathological evaluation of 3xTg-AD mice

(a) Tangential brain sections of 6, 12, and 18 month-old 3xTg-AD mice immunostained with 4G8 or OC antibodies. Progression of the amyloid pathology is slow, and whereas intraneuronal A β is already present in 6 month-old 3xTg-AD mice, oligomers and extracellular plaques are detected only in the subiculum and not the CA1 region of the hippocampus in 12 and 18 month-old 3xTg-AD mice. (b) Tangential brain section of a 6, 12, and 18 month-old 3xTg-AD mouse immunostained with HT7, AT8, or AT180 tau antibodies. (c) Tangential brain section of a 6 and 12 month-old 3xTg-AD male and female mouse immunostained with 4G8 showing a more aggressive AD phenotype in the female relative to that of the male in the 3xTg-AD mouse model.

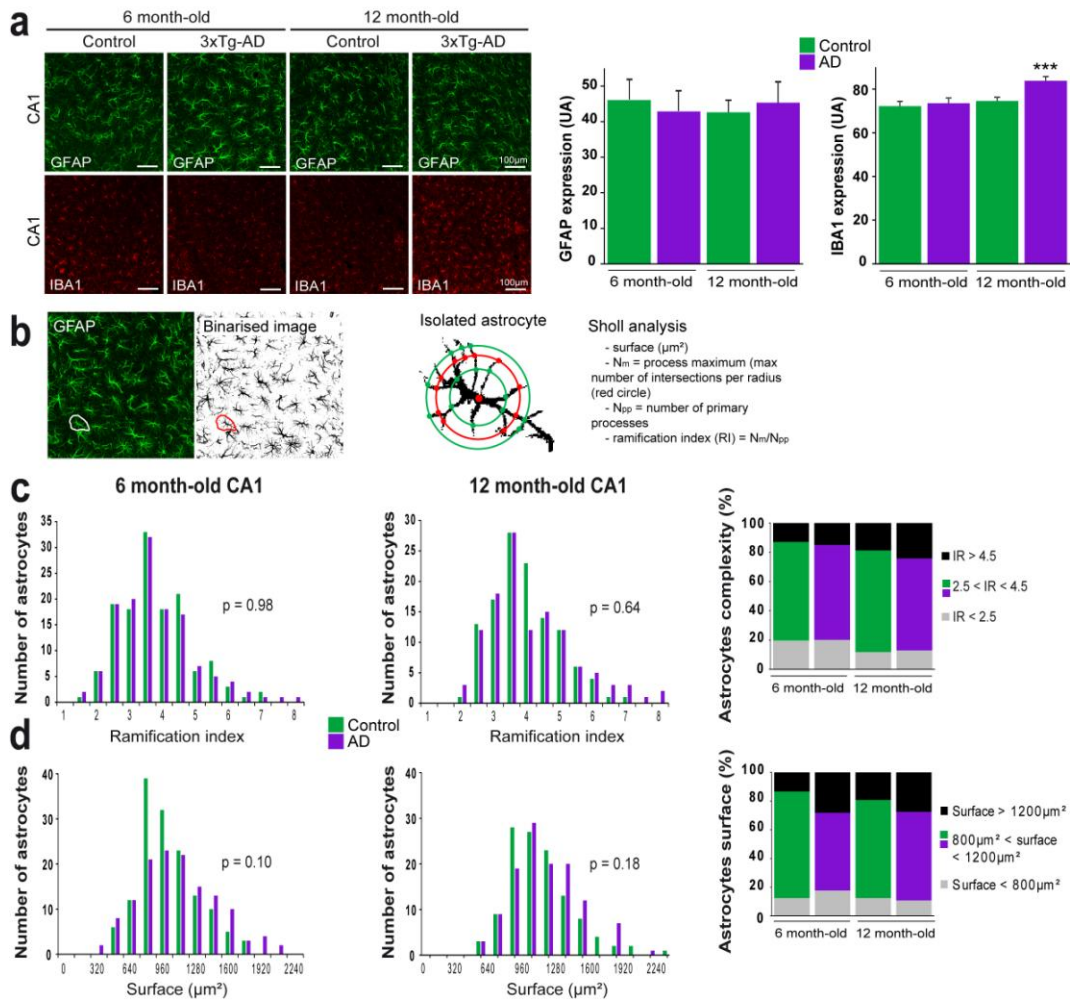


Figure 2. No astrocyte reactivity in the CA1 region of 3xTg-AD mice

(a) Immunofluorescent staining of 6 and 12 month-old control and 3xTg-AD mouse brain using GFAP and IBA1 antibodies. The global expression of GFAP, quantified using ImageJ, was unaltered in the CA1 region at both ages. The expression of IBA1 was significantly higher only in 12 month-old 3xTg-AD mice. (One-way ANOVA $**p < 0.05$) (b) Illustration of Sholl analysis performed on a binarized image taken from a GFAP immunostaining. Astrocytes were manually outlined and the Sholl analysis was performed using ImageJ. Sholl analysis generates several parameters such as the surface, the N_m (process maximum) and the ramification index (RI) for each analyzed cell. Astrocytes of 6 month-old (control $n = 136$, 3xTg-AD $n = 135$) and 12 month-old (control $n = 120$, 3xTg-AD $n = 120$) mice were analyzed using Sholl analysis. (c, d) The distribution of the ramification index and the surface was similar for all groups (Chi² test), indicating that astrocytes in the CA1 region of 6 and 12 month-old 3xTg-AD mice are not reactive .

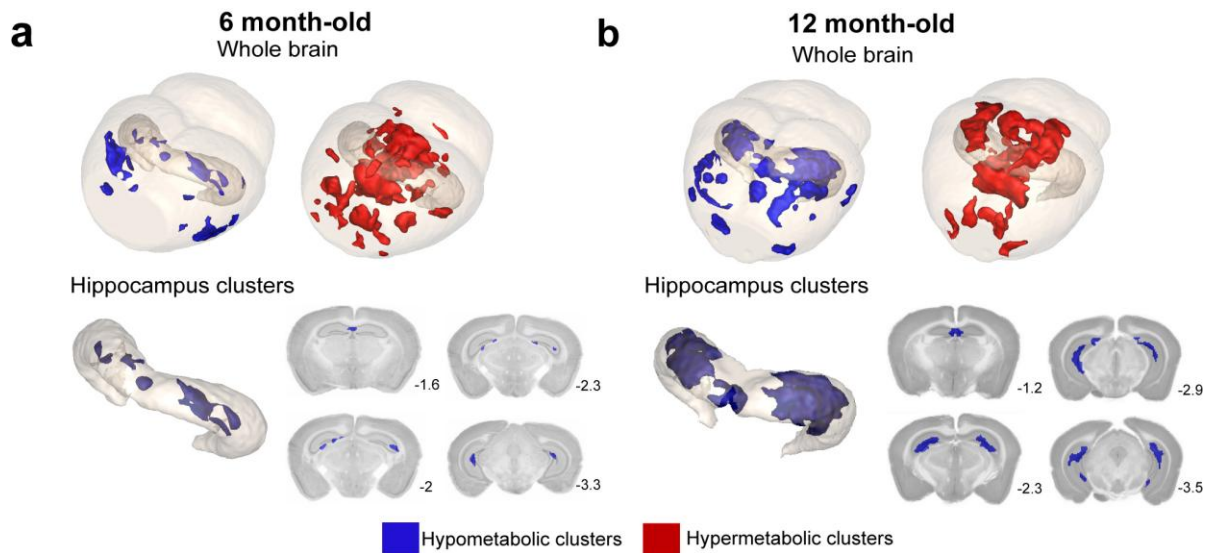


Figure 3. 3xTG-AD mice display energy metabolism alterations *in vivo*

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

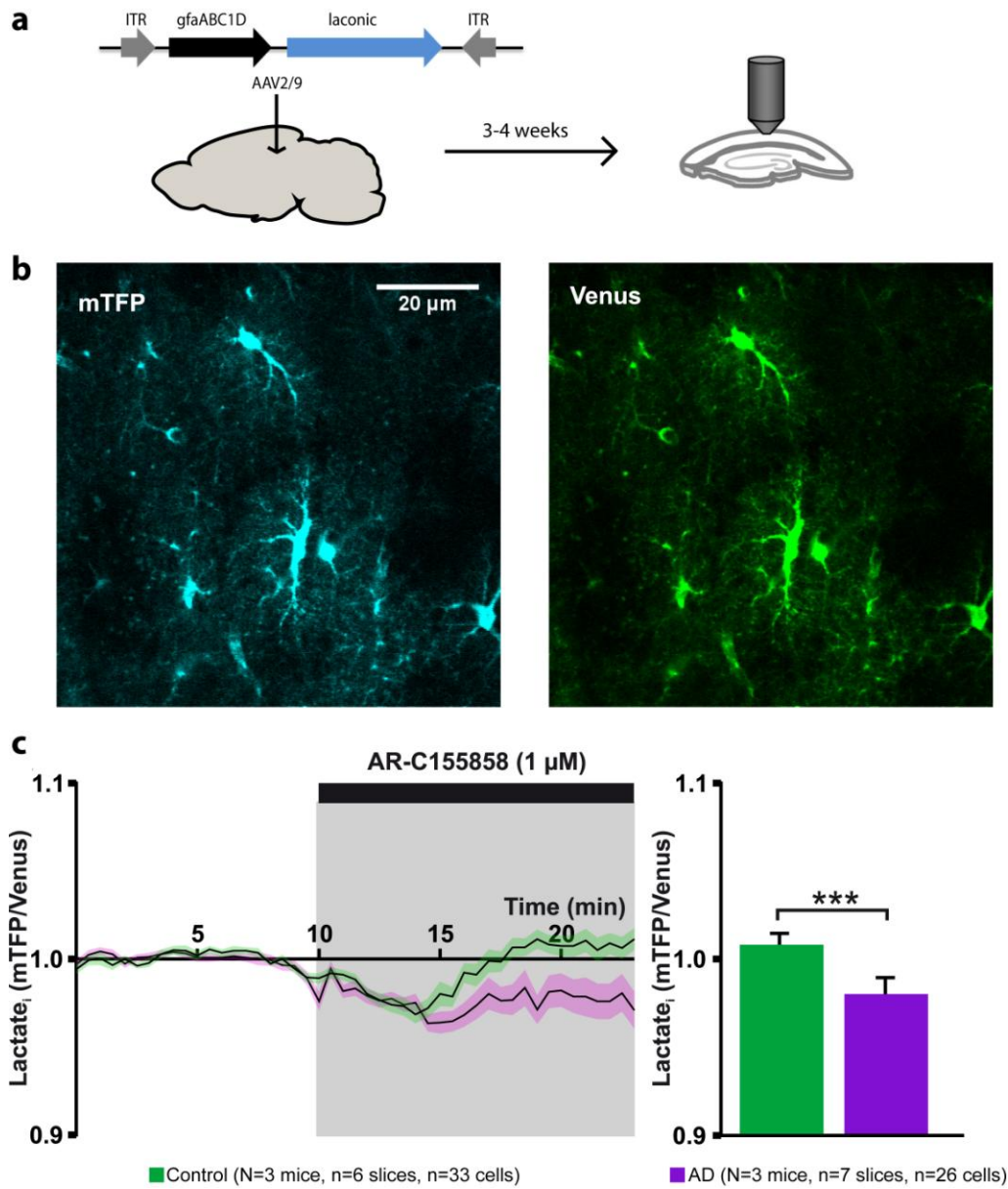


Figure 4. Altered metabolism in astrocytes of 3xTg-AD mice

(a) Design of the AAV2/9 expressing the FRET sensor Laconic that was injected in the CA1 region of the hippocampus in control ($n = 3$) and 3xTg-AD ($n = 3$) mice. (b) CA1 astrocytes expressing the FRET lactate sensor Laconic in an acute hippocampal slice showing mTFP (blue) and Venus (green). (c) Response of intracellular lactate to bath application of 1 μM AR-C155858, a monocarboxylate transporter blocker. Astrocytes of 3xTg-AD mice do not accumulate lactate relative to control astrocytes (Mann-Whitney U Test, *** $p < 0.001$).

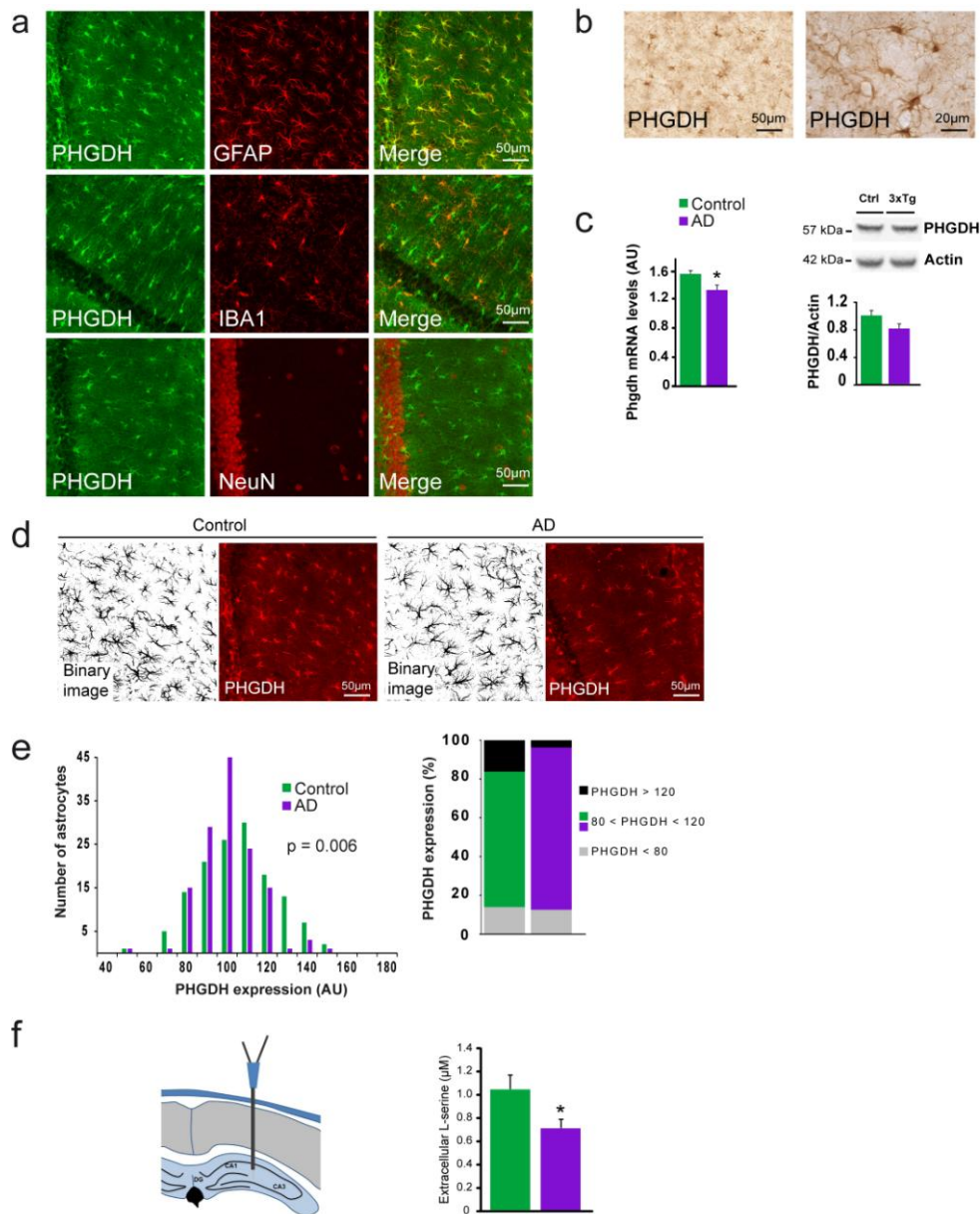


Figure 5. Metabolism of L-serine is altered in 3xTg-AD mice

(a) Double immunofluorescent staining of brain sections from 6 month-old control mice using PHGDH (green) and either an astrocyte marker (GFAP, red), a microglial marker (IBA1, red), or a neuronal marker (NeuN, red). (b) Immunostaining of PHGDH in the hippocampus of a control non-human primate brain. (c) Quantification of RT-qPCR data for PHGDH mRNA in control (n = 5) and 3xTg-AD (n = 9) mice (Student's t test, p = 0.039) and immunoblotting for PHGDH in the CA1 and quantification in 6 month-old 3xTg-AD (n = 7) and control (n = 6) mice (NS, Student's t test, p = 0.62). (d, e) Quantification of PHGDH expression in individual astrocytes isolated during the Sholl analysis. Graph bars showing the differential distribution of PHGDH expression among the astrocytic population of the CA1 region in control (n = 136) and 3xTg-AD mice (n = 135); χ^2 test, **p<0.01. (f) Concentration of extracellular L-serine in the hippocampus of 6 month-old control (n = 8) and 3xTg-AD mice (n = 9) measured by microdialysis; Student's t test *p<0.05.

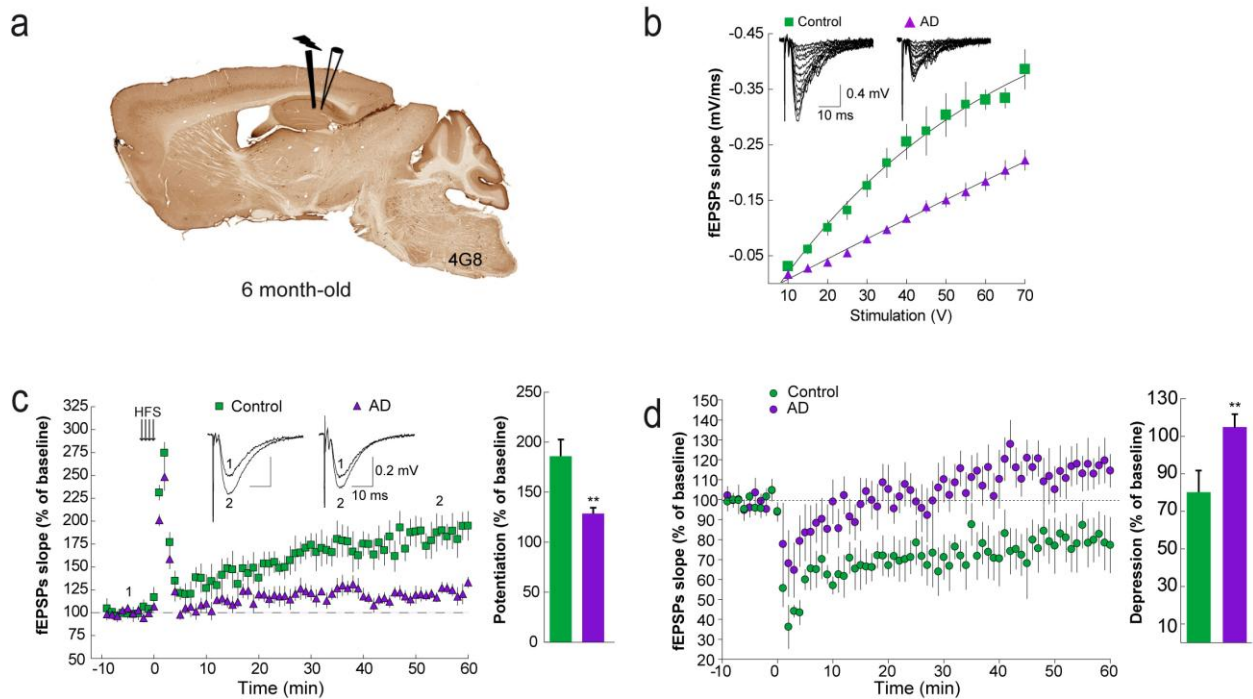


Figure 6. Deficit of synaptic plasticity at CA3-CA1 synapses in 3xTg-AD mice

(a) Tangential brain section of a 6 month-old 3xTg-AD mouse immunostained with 4G8 indicating the locations of the stimulating and recording electrodes in the CA1 region at a time when only intraneuronal A β is present in the cortex and the hippocampal formation. (b) Traces (average of 3 sweeps) are representative fEPSPs. Input/output curves in control (green squares) and 3xTg-AD mice (purple triangles) revealing that basal glutamatergic synaptic transmission was impaired in 3xTg-AD mice. (c) Traces represent typical fEPSPs evoked before (1) and after (2) LTP induction. LTP was significantly impaired in 3xTg-AD mice. (d) Representative traces of characteristic fEPSPs evoked before and after LTD induction. LTD was significantly impaired in 3xTg-AD mice.

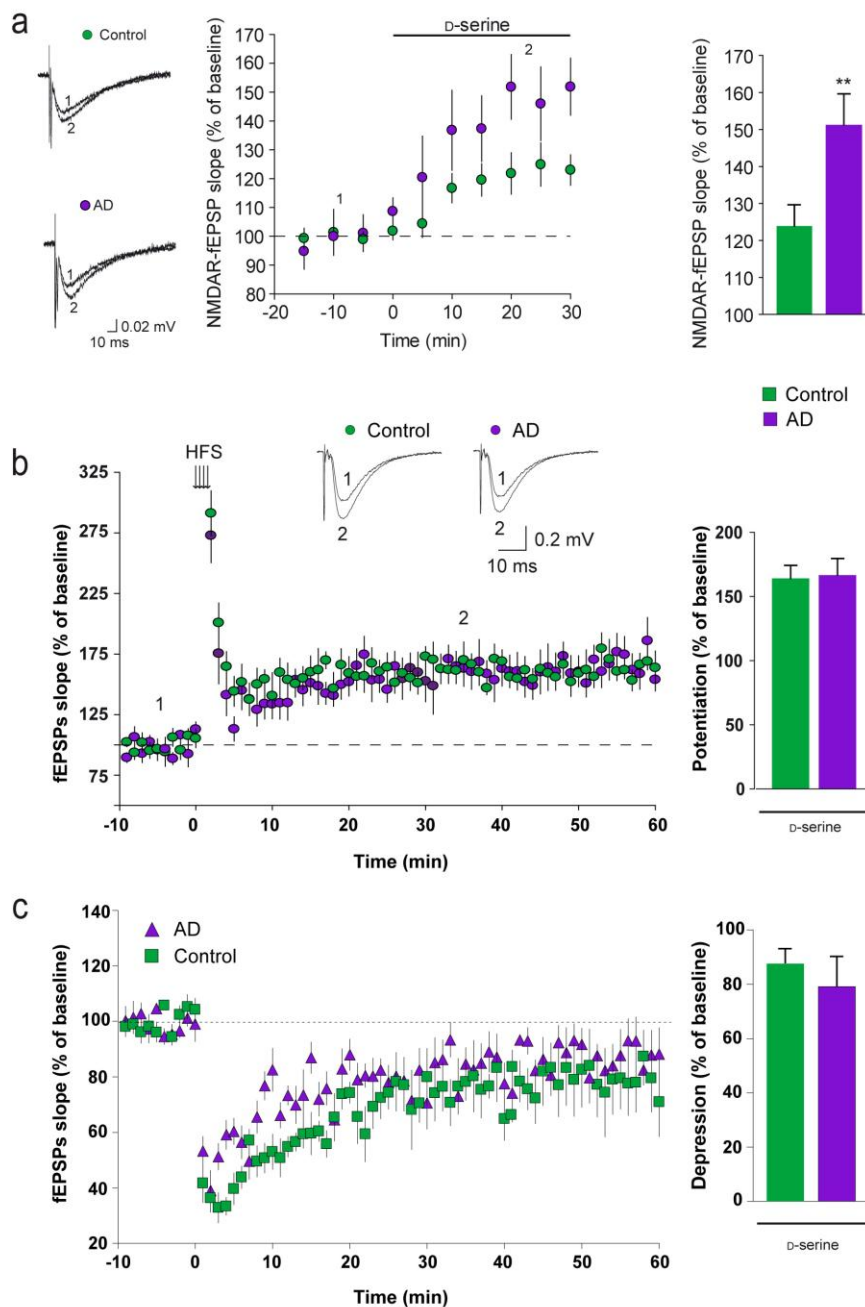


Figure 7. Deficits in LTP and LTD in 3xTg-AD mice are due to a decrease of D-serine availability

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

REFERENCES

1. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356 (2002).
2. Spire-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* **82**, 756-771 (2014).
3. Lambert MP, *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A beta(1-42) are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6448-6453 (1998).
4. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Bio* **8**, 101-112 (2007).
5. Tu SC, Okamoto S, Lipton SA, Xu HX. Oligomeric A beta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **9**, (2014).
6. Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* **463**, 232-236 (2010).
7. Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for L-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *J Neurosci* **21**, 7691-7704 (2001).
8. Yang JH, *et al.* Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *J Biol Chem* **285**, 41380-41390 (2010).
9. Ehmsen JT, *et al.* D-Serine in Glia and Neurons Derives from 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase. *Journal of Neuroscience* **33**, 12464-12469 (2013).
10. Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ. Pre-Clinical Detection of Alzheimer's Disease Using FDG-PET, with or without Amyloid Imaging. *Journal of Alzheimers Disease* **20**, 843-854 (2010).
11. Cohen AD, Klunk WE. Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiology of Disease* **72**, 117-122 (2014).
12. Chen ZC, Zhong CJ. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* **108**, 21-43 (2013).
13. Vlassenko AG, *et al.* Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid-beta (A beta) deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 17763-17767 (2010).
14. Winkler EA, *et al.* GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature Neuroscience* **18**, 521-+ (2015).
15. Oddo S, *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-421 (2003).
16. Dubois A, *et al.* Quantitative validation of voxel-wise statistical analyses of autoradiographic rat brain volumes: application to unilateral visual stimulation. *Neuroimage* **40**, 482-494 (2008).

17. Vandenberghe ME, *et al.* High-throughput 3D whole-brain quantitative histopathology in rodents. *Sci Rep-Uk* **6**, (2016).
18. San Martin A, Ceballo S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF. A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and Its Use To Detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells. *Plos One* **8**, (2013).
19. Berger A, *et al.* Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **23**, 918-930 (2015).
20. Hay YA, Lambolez B, Tricoire L. Nicotinic Transmission onto Layer 6 Cortical Neurons Relies on Synaptic Activation of Non-alpha7 Receptors. *Cereb Cortex*, (2015).
21. Sholl DA. Dendritic Organization in the Neurons of the Visual and Motor Cortices of the Cat. *Journal of Anatomy* **87**, 387-& (1953).
22. Lorenzo MP, Villasenor A, Ramamoorthy A, Garcia A. Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: Application to bipolar disorder study. *Electrophoresis* **34**, 1701-1709 (2013).
23. Nelson RL, *et al.* Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Experimental Neurology* **205**, 166-176 (2007).
24. Hirata-Fukae C, *et al.* Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Research* **1216**, 92-103 (2008).
25. Ben Haim L, *et al.* The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J Neurosci* **35**, 2817-2829 (2015).
26. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A beta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45**, 675-688 (2005).
27. Dubois A, *et al.* Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* **51**, 586-598 (2010).
28. Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* **86**, 883-901 (2015).
29. Sotelo-Hitschfeld T, *et al.* Channel-mediated lactate release by K(+)-stimulated astrocytes. *J Neurosci* **35**, 4168-4178 (2015).
30. Ovens MJ, Davies AJ, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP. AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *Biochemical Journal* **425**, 523-530 (2010).
31. Silver IA, Erecinska M. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci* **14**, 5068-5076 (1994).
32. Papouin T, *et al.* Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* **150**, 633-646 (2012).

33. Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiology of Disease* **9**, 61-68 (2002).
34. Nicholson RM, Kusne Y, Nowak LA, LaFerla FM, Reiman EM, Valla J. Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain Res* **1347**, 179-185 (2010).
35. Niwa K, Carlson GA, Iadecola C. Exogenous A beta 1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **20**, 1659-1668 (2000).
36. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Bi* **27**, 441-464 (2011).
37. Acuna-Hidalgo R, *et al.* Neu-Laxova Syndrome Is a Heterogeneous Metabolic Disorder Caused by Defects in Enzymes of the L-Serine Biosynthesis Pathway. *American Journal of Human Genetics* **95**, 285-293 (2014).
38. Cummings DM, *et al.* First effects of rising amyloid-beta in transgenic mouse brain: synaptic transmission and gene expression. *Brain* **138**, 1992-2004 (2015).
39. Chakroborty S, Goussakov I, Miller MB, Stutzmann GE. Deviant Ryanodine Receptor-Mediated Calcium Release Resets Synaptic Homeostasis in Presymptomatic 3xTg-AD Mice. *Journal of Neuroscience* **29**, 9458-9470 (2009).
40. Chakroborty S, Kim J, Schneider C, Jacobson C, Molgo J, Stutzmann GE. Early Presynaptic and Postsynaptic Calcium Signaling Abnormalities Mask Underlying Synaptic Depression in Presymptomatic Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Neuroscience* **32**, 8341-8353 (2012).
41. Suzuki A, *et al.* Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* **144**, 810-823 (2011).
42. Yang JY, *et al.* Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12228-12233 (2014).
43. Hondius DC, *et al.* Profiling the human hippocampal proteome at all pathologic stages of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, (2016).

Bibliographie

- Abel, H.J., Lee, J.C.F., Callaway, J.C., Foehring, R.C., 2004. Relationships between intracellular calcium and afterhyperpolarizations in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 91, 324–335. doi :10.1152/jn.00583.2003
- Abercrombie, E.D., Jacobs, B.L., 1987. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. II. Adaptation to chronically presented stressful stimuli. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 7, 2844–2848.
- Abramov, A.Y., Canevari, L., Duchen, M.R., 2003. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5088–5095.
- Acosta, C., Anderson, H.D., Anderson, C.M., 2017. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.* doi:10.1002/jnr.24075
- Ahlquist, R.P., 1948. A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153, 586–600.
- Aizenstein, H.J., Nebes, R.D., Saxton, J.A., Price, J.C., Mathis, C.A., Tsopelas, N.D., Ziolkowski, S.K., James, J.A., Snitz, B.E., Houck, P.R., Bi, W., Cohen, A.D., Lopresti, B.J., DeKosky, S.T., Halligan, E.M., Klunk, W.E., 2008. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch. Neurol.* 65, 1509–1517. doi:10.1001/archneur.65.11.1509
- Albert, M.S., DeKosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C., Gamst, A., Holtzman, D.M., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Snyder, P.J., Carrillo, M.C., Thies, B., Phelps, C.H., 2011. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 270–279. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008
- Albin, R.L., Minoshima, S., D'Amato, C.J., Frey, K.A., Kuhl, D.A., Sima, A.A., 1996. Fluoro-deoxyglucose positron emission tomography in diffuse Lewy body disease. *Neurology* 47, 462–466.
- Allaman, I., Bélanger, M., Magistretti, P.J., 2015. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front. Neurosci.* 9, 23. doi :10.3389/fnins.2015.00023
- Allaman, I., Bélanger, M., Magistretti, P.J., 2011. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 34, 76–87. doi : 10.1016/j.tins.2010.12.001
- Almeida, A., Bolaños, J.P., 2001. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 77, 676–690.
- Almeida, A., Moncada, S., Bolaños, J.P., 2004. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat. Cell Biol.* 6, 45–51. doi:10.1038/ncb1080
- Al-Nuaimi, A.H., Jammeh, E., Lingfen Sun, null, Ifeachor, E., 2016. Changes in the EEG amplitude as a biomarker for early detection of Alzheimer's disease. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* 2016, 993–996. doi:10.1109/EMBC.2016.7590869
- Ames, A., 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 34, 42–68.
- Ames, A., Maynard, K.I., Kaplan, S., 1995. Protection against CNS ischemia by temporary interruption of function-related processes of neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 433–439. doi:10.1038/jcbfm.1995.54
- Ames, G.F., Lecar, H., 1992. ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: analogy between channels and transporters. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 2660–2666.
- Amicarelli, F., Colafarina, S., Cattani, F., Cimini, A., Di Ilio, C., Ceru, M.P., Miranda, M., 2003. Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 856–871.
- Andrade, R., Foehring, R.C., Tzingounis, A.V., 2012. The calcium-activated slow AHP: cutting through the Gordian knot. *Front. Cell. Neurosci.* 6, 47. doi:10.3389/fncel.2012.00047
- Aoki, K., Matsuda, M., 2009. Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nat. Protoc.* 4, 1623–1631. doi:10.1038/nprot.2009.175
- Apelt, J., Mehlhorn, G., Schliebs, R., 1999. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 57, 693–705.
- Araneda, R., Andrade, R., 1991. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40, 399–412.

- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., Penicaud, L., 2004. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* 28, 117–136. doi: 10.1016/j.jchemneu.2004.05.009
- Armstrong, M.D., McMillan, A., 1959. Studies on the formation of 3-methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine and epinephrine. *Pharmacol. Rev.* 11, 394–401.
- Armstrong, M.D., McMILLAN, A., Shaw, K.N., 1957. 3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 422–423.
- Armstrong, R.A., 2009. Alzheimer's Disease and the Eye☆. *J. Optom.* 2, 103–111. doi:10.3921/joptom.2009.103
- Arnsten, A.F., Mathew, R., Ubriani, R., Taylor, J.R., Li, B.M., 1999. Alpha-1 noradrenergic receptor stimulation impairs prefrontal cortical cognitive function. *Biol. Psychiatry* 45, 26–31.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631–639.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 5559–5569.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., Kubiak, P., 1997. Conditioned responses of monkey locus coeruleus neurons anticipate acquisition of discriminative behavior in a vigilance task. *Neuroscience* 80, 697–715.
- Astrup, J., Sørensen, P.M., Sørensen, H.R., 1981. Inhibition of cerebral oxygen and glucose consumption in the dog by hypothermia, pentobarbital, and lidocaine. *Anesthesiology* 55, 263–268.
- Atamna, H., Frey, W.H., 2007. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 7, 297–310. doi : 10.1016/j.mito.2007.06.001
- Attwell, D., Gibb, A., 2005. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 841–849. doi:10.1038/nrn1784
- Attwell, D., Iadecola, C., 2002. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* 25, 621–625.
- Attwell, D., Laughlin, S.B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1133–1145. doi:10.1097/00004647-200110000-00001
- Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Wuytack, F., De Greef, C., Missiaen, L., Casteels, R., 1996. Distribution of the organellar Ca²⁺ transport ATPase SERCA2 isoforms in the cat brain. *Brain Res.* 743, 141–153.
- Bacskai, B.J., Hickey, G.A., Skoch, J., Kajdasz, S.T., Wang, Y., Huang, G.-F., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Hyman, B.T., 2003. Four-dimensional multiphoton imaging of brain entry, amyloid binding, and clearance of an amyloid-beta ligand in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12462–12467. doi:10.1073/pnas.2034101100
- Bady, I., Marty, N., Dallaporta, M., Emery, M., Gyger, J., Tarussio, D., Foretz, M., Thorens, B., 2006. Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes* 55, 988–995.
- Bagyinszky, E., Giau, V.V., Shim, K., Suk, K., An, S.S.A., Kim, S., 2017. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J. Neurol. Sci.* 376, 242–254. doi : 10.1016/j.jns.2017.03.031
- Baloyannis, S.J., 2006. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 119–126.
- Baraban, S.C., Tallent, M.K., 2004. Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides--endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci.* 27, 135–142. doi : 10.1016/j.tins.2004.01.008
- Barage, S.H., Sonawane, K.D., 2015. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 52, 1–18. doi : 10.1016/j.npep.2015.06.008
- Barak, L.S., Ferguson, S.S., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T., Caron, M.G., 1997. Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol. Pharmacol.* 51, 177–184.
- Barros, L.F., 2013. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci.* 36, 396–404. doi: 10.1016/j.tins.2013.04.002
- Barthel, H., Gertz, H.-J., Dresel, S., Peters, O., Bartenstein, P., Buerger, K., Hiemeyer, F., Wittmer-Rump, S.M., Seibyl, J., Reiningner, C., Sabri, O., Florbetaben Study Group, 2011. Cerebral amyloid-β PET with florbetaben (18F) in patients with Alzheimer's disease and healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. *Lancet Neurol.* 10, 424–435. doi:10.1016/S1474-4422(11)70077-1
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., Holtzman, D.M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P.S., Ghetti, B., Klunk, W.E., McDade, E., Martins, R.N., Masters, C.L., Mayeux, R., Ringman, J.M., Rossor, M.N., Schofield, P.R., Sperling, R.A., Salloway, S., Morris, J.C., Dominantly Inherited

- Alzheimer Network, 2012. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 795–804. doi:10.1056/NEJMoa1202753
- Battaglia, D., Karagiannis, A., Gallopin, T., Gutch, H.W., Cauli, B., 2013. Beyond the frontiers of neuronal types. *Front. Neural Circuits* 7, 13. doi:10.3389/fncir.2013.00013
- Baughman, R.W., Gilbert, C.D., 1981. Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 1, 427–439.
- Bayewitch, M.L., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Pfeuffer, T., Nevo, I., Simonds, W.F., Vogel, Z., 1998. Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G beta subunits. *J. Biol. Chem.* 273, 2273–2276.
- Beamer, L.J., 2015. Mutations in hereditary phosphoglucomutase 1 deficiency map to key regions of enzyme structure and function. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 243–256. doi:10.1007/s10545-014-9757-9
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1620–1624.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.
- Bekar, L.K., Wei, H.S., Nedergaard, M., 2012. The locus coeruleus-norepinephrine network optimizes coupling of cerebral blood volume with oxygen demand. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 2135–2145. doi:10.1038/jcbfm.2012.115
- Bélanger, M., Yang, J., Petit, J.-M., Laroche, T., Magistretti, P.J., Allaman, I., 2011. Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 18338–18352. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1249-11.2011
- Benavides-Piccione, R., Fernaud-Espinosa, I., Robles, V., Yuste, R., DeFelipe, J., 2013. Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 23, 1798–1810. doi:10.1093/cercor/bhs154
- Ben-Yoseph, O., Boxer, P.A., Ross, B.D., 1994. Oxidative stress in the central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway. *Dev. Neurosci.* 16, 328–336.
- Berchtold, N.C., Cotman, C.W., 1998. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol. Aging* 19, 173–189.
- Berger, B., Alvarez, C., 1994. Neurochemical development of the hippocampal region in the fetal rhesus monkey. II. Immunocytochemistry of peptides, calcium-binding proteins, DARPP-32, and monoamine innervation in the entorhinal cortex by the end of gestation. *Hippocampus* 4, 85–114. doi:10.1002/hipo.450040111
- Bergersen, L.H., 2007. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 145, 11–19. doi : 10.1016/j.neuroscience.2006.11.062
- Bernstein, H.-G., Blazejczyk, M., Rudka, T., Gundelfinger, E.D., Dobrowolny, H., Bogerts, B., Kreutz, M.R., Kuznicki, J., Wojda, U., 2005. The Alzheimer disease-related calcium-binding protein Calmyrin is present in human forebrain with an altered distribution in Alzheimer's as compared to normal ageing brains. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 31, 314–324. doi : 10.1111/j.1365-2990.2005.00646.x
- Berridge, C.W., Schmeichel, B.E., España, R.A., 2012. Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. *Sleep Med. Rev.* 16, 187–197. doi : 10.1016/j.smrv.2011.12.003
- Berridge, C.W., Waterhouse, B.D., 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42, 33–84.
- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P.J., Hirt, L., 2009. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1780–1789. doi : 10.1038/jcbfm.2009.97
- Berti, V., Osorio, R.S., Mosconi, L., Li, Y., De Santi, S., de Leon, M.J., 2010. Early detection of Alzheimer's disease with PET imaging. *Neurodegener. Dis.* 7, 131–135. doi:10.1159/000289222
- Bhagvat, K., Blaschko, H., Richter, D., 1939. Amine oxidase. *Biochem. J.* 33, 1338–1341.
- Birnbaum, S.G., Podell, D.M., Arnsten, A.F., 2000. Noradrenergic alpha-2 receptor agonists reverse working memory deficits induced by the anxiogenic drug, FG7142, in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67, 397–403.
- Biswas, C., Shah, N., Muthu, M., La, P., Fernando, A.P., Sengupta, S., Yang, G., Dennery, P.A., 2014. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J. Biol. Chem.* 289, 26882–26894. doi:10.1074/jbc.M114.567685
- Bittner, C.X., Loaiza, A., Ruminot, I., Larenas, V., Sotelo-Hitschfeld, T., Gutiérrez, R., Córdova, A., Valdebenito, R., Frommer, W.B., Barros, L.F., 2010. High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front. Neuroenergetics* 2. doi:10.3389/fnene.2010.00026

- Bittner, C.X., Valdebenito, R., Ruminot, I., Loaiza, A., Larenas, V., Sotelo-Hitschfeld, T., Moldenhauer, H., San Martín, A., Gutiérrez, R., Zambrano, M., Barros, L.F., 2011. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 4709–4713. doi:10.1523/JNEUROSCI.5311-10.2011
- Blalock, E.M., Geddes, J.W., Chen, K.C., Porter, N.M., Markesbery, W.R., Landfield, P.W., 2004. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2173–2178. doi:10.1073/pnas.0308512100
- Blaschko, H., 1957. Formation of catechol amines in the animal body. *Br. Med. Bull.* 13, 162–165.
- Blaschko, H., 1954. Metabolism of epinephrine and norepinephrine. *Pharmacol. Rev.* 6, 23–28.
- Blaschko, H., Burn, J.H., Langemann, H., 1950. The formation of noradrenaline from dihydroxyphenylserine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 5, 431–437.
- Blaschko, H., Richter, D., Schlossmann, H., 1937a. The oxidation of adrenaline and other amines. *Biochem. J.* 31, 2187–2196.
- Blaschko, H., Richter, D., Schlossmann, H., 1937b. The inactivation of adrenaline. *J. Physiol.* 90, 1–17.
- Bliss, T.M., Ip, M., Cheng, E., Minami, M., Pellerin, L., Magistretti, P., Sapolsky, R.M., 2004. Dual-gene, dual-cell type therapy against an excitotoxic insult by bolstering neuroenergetics. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 6202–6208. doi:10.1523/JNEUROSCI.0805-04.2004
- Blough, N.V., Zafiriou, O.C., 1985. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* 24, 3502–3504. doi:10.1021/ic00216a003
- Bolaños, J.P., 2016. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J. Neurochem.* 139 Suppl 2, 115–125. doi:10.1111/jnc.13486
- Bolaños, J.P., Almeida, A., 2010. The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress. *IUBMB Life* 62, 14–18. doi:10.1002/iub.280
- Bolaños, J.P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J.M., Clark, J.B., Heales, S.J., 1997. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 68, 2227–2240.
- Bolaños, J.P., Heales, S.J., Land, J.M., Clark, J.B., 1995. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 64, 1965–1972.
- Bolaños, J.P., Heales, S.J., Peuchen, S., Barker, J.E., Land, J.M., Clark, J.B., 1996. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 995–1001.
- Bondy, C.A., Lee, W.H., Zhou, J., 1992. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol. Cell. Neurosci.* 3, 305–314.
- Boumezbeur, F., Petersen, K.F., Cline, G.W., Mason, G.F., Behar, K.L., Shulman, G.I., Rothman, D.L., 2010. The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 13983–13991. doi : 10.1523/JNEUROSCI.2040-10.2010
- Bouret, S., Sara, S.J., 2004. Reward expectation, orientation of attention and locus coeruleus-medial frontal cortex interplay during learning. *Eur. J. Neurosci.* 20, 791–802. doi : 10.1111/j.1460-9568.2004.03526.x
- Bouret, S., Sara, S.J., 2002. Locus coeruleus activation modulates firing rate and temporal organization of odour-induced single-cell responses in rat piriform cortex. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2371–2382.
- Bourgeat, P., Chételat, G., Villemagne, V.L., Fripp, J., Raniga, P., Pike, K., Acosta, O., Szoëke, C., Ourselin, S., Ames, D., Ellis, K.A., Martins, R.N., Masters, C.L., Rowe, C.C., Salvado, O., AIBL Research Group, 2010. Beta-amyloid burden in the temporal neocortex is related to hippocampal atrophy in elderly subjects without dementia. *Neurology* 74, 121–127. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c918b5
- Boutet, C., Chupin, M., Lehericy, S., Marrakchi-Kacem, L., Epelbaum, S., Poupon, C., Wiggins, C., Vignaud, A., Hasboun, D., Defontaine, B., Hanon, O., Dubois, B., Sarazin, M., Hertz-Pannier, L., Colliot, O., 2014. Detection of volume loss in hippocampal layers in Alzheimer's disease using 7 T MRI: a feasibility study. *NeuroImage Clin.* 5, 341–348. doi : 10.1016/j.nicl.2014.07.011
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.-M., Pellerin, L., 2006. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1687–1694. doi : 10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P.J., Pellerin, L., 2003. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1298–1306. doi : 10.1097/01.WCB.0000091761.61714.25
- Braak, H., Braak, E., 1997. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* 18, 351–357.

- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 239–259.
- Brain energy metabolism by B. K. Siesjo, John Wiley & Sons, New York, 1978, 1979. *Ann. Neurol.* 5, 308–308. doi:10.1002/ana.410050318
- Breitwieser, G.E., 2004. G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ. Res.* 94, 17–27. doi : 10.1161/01.RES.0000110420.68526.19
- Briand, L.A., Gritton, H., Howe, W.M., Young, D.A., Sarter, M., 2007. Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex. *Prog. Neurobiol.* 83, 69–91. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.06.007
- Brightwell, J.J., Smith, C.A., Neve, R.L., Colombo, P.J., 2007. Long-term memory for place learning is facilitated by expression of cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 14, 195–199. doi:10.1101/lm.395407
- Brini, M., Carafoli, E., 2011. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3. doi:10.1101/cshperspect.a004168
- Bröcher, S., Artola, A., Singer, W., 1992. Agonists of cholinergic and noradrenergic receptors facilitate synergistically the induction of long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Brain Res.* 573, 27–36.
- Bröer, S., Brookes, N., 2001. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 77, 705–719.
- Brown, A.M., 2004. Brain glycogen re-awakened. *J. Neurochem.* 89, 537–552. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02421.x
- Brown, A.M., Sickmann, H.M., Fosgerau, K., Lund, T.M., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., Ransom, B.R., 2005. Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J. Neurosci. Res.* 79, 74–80. doi:10.1002/jnr.20335
- Brown, R.E., Basheer, R., McKenna, J.T., Strecker, R.E., McCarley, R.W., 2012. Control of sleep and wakefulness. *Physiol. Rev.* 92, 1087–1187. doi:10.1152/physrev.00032.2011
- Bruce-Keller, A.J., Umberger, G., McFall, R., Mattson, M.P., 1999. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann. Neurol.* 45, 8–15.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., Gibson, G.E., 2005. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann. Neurol.* 57, 695–703. doi:10.1002/ana.20474
- Buchhave, P., Minthon, L., Zetterberg, H., Wallin, A.K., Blennow, K., Hansson, O., 2012. Cerebrospinal fluid levels of β -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 98–106. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.155
- Buckner, R.L., Snyder, A.Z., Shannon, B.J., LaRossa, G., Sachs, R., Fotenos, A.F., Sheline, Y.I., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Morris, J.C., Mintun, M.A., 2005. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7709–7717. doi:10.1523/JNEUROSCI.2177-05.2005
- Butterworth, R.F., Besnard, A.M., 1990. Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.* 5, 179–184.
- Buzsáki, G., Kaila, K., Raichle, M., 2007. Inhibition and brain work. *Neuron* 56, 771–783. doi : 10.1016/j.neuron.2007.11.008
- Bylund, D.B., 2007. Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E1479-1481. doi:10.1152/ajpendo.00664.2007
- Bylund, D.B., 1992. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 832–839.
- Caesar, K., Hashemi, P., Douhou, A., Bonvento, G., Boutelle, M.G., Walls, A.B., Lauritzen, M., 2008. Glutamate receptor-dependent increments in lactate, glucose and oxygen metabolism evoked in rat cerebellum in vivo. *J. Physiol.* 586, 1337–1349. doi : 10.1113/jphysiol.2007.144154
- Cai, Z., Zhao, B., Li, K., Zhang, L., Li, C., Quazi, S.H., Tan, Y., 2012. Mammalian target of rapamycin: a valid therapeutic target through the autophagy pathway for Alzheimer's disease? *J. Neurosci. Res.* 90, 1105–1118. doi : 10.1002/jnr.23011
- Cameron, H.A., McKay, R.D., 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci.* 2, 894–897. doi : 10.1038/13197
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T., 1999. Early-onset autosomal dominant Alzheimer

- disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 664–670. doi:10.1086/302553
- Cardoso, S.M., Santos, S., Swerdlow, R.H., Oliveira, C.R., 2001. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 1439–1441.
- Carr, D.B., Andrews, G.D., Glen, W.B., Lavin, A., 2007. α 2-Noradrenergic receptors activation enhances excitability and synaptic integration in rat prefrontal cortex pyramidal neurons via inhibition of HCN currents. *J. Physiol.* 584, 437–450. doi:10.1113/jphysiol.2007.141671
- Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., Devaskar, S.U., 2009. Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E836–848. doi:10.1152/ajpendo.00496.2009
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J.W., Xu, H.W., Stern, D., McKhann, G., Yan, S.D., 2005. Mitochondrial A β : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 2040–2041. doi : 10.1096/fj.05-3735fje
- Cassens, G., Roffman, M., Kuruc, A., Orsulak, P.J., Schildkraut, J.J., 1980. Alterations in brain norepinephrine metabolism induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Science* 209, 1138–1140.
- Castellani, R.J., Harris, P.L., Sayre, L.M., Fujii, J., Taniguchi, N., Vitek, M.P., Founds, H., Atwood, C.S., Perry, G., Smith, M.A., 2001. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(ϵ)-carboxymethyl lysine and hexitol-lysine. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 175–180.
- Cataldo, A.M., Broadwell, R.D., 1986. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J. Neurocytol.* 15, 511–524.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., Rossier, J., 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 3894–3906.
- Cauli, B., Porter, J.T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., Audinat, E., 2000. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6144–6149.
- Cauli, B., Tong, X.-K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., Hamel, E., 2004. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8940–8949. doi:10.1523/JNEUROSCI.3065-04.2004
- Cerdán, S., Rodrigues, T.B., Sierra, A., Benito, M., Fonseca, L.L., Fonseca, C.P., García-Martín, M.L., 2006. The redox switch/redox coupling hypothesis. *Neurochem. Int.* 48, 523–530. doi : 10.1016/j.neuint.2005.12.036
- Chan, S.L., Culmsee, C., Haughey, N., Klapper, W., Mattson, M.P., 2002. Presenilin-1 mutations sensitize neurons to DNA damage-induced death by a mechanism involving perturbed calcium homeostasis and activation of calpains and caspase-12. *Neurobiol. Dis.* 11, 2–19.
- Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D.R., Edwards, R.H., 1999. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 99, 769–780.
- Chen, K., Maley, J., Yu, P.H., 2006. Potential implications of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis. *J. Neurochem.* 99, 1413–1424. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04181.x
- Chen, Z., Zhong, C., 2013. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog. Neurobiol.* 108, 21–43. doi : 10.1016/j.pneurobio.2013.06.004
- Cheun, J.E., Yeh, H.H., 1996. Noradrenergic potentiation of cerebellar Purkinje cell responses to GABA: cyclic AMP as intracellular intermediary. *Neuroscience* 74, 835–844.
- Chhina, N., Kuestermann, E., Halliday, J., Simpson, L.J., Macdonald, I.A., Bachelard, H.S., Morris, P.G., 2001. Measurement of human tricarboxylic acid cycle rates during visual activation by (13) C magnetic resonance spectroscopy. *J. Neurosci. Res.* 66, 737–746. doi:10.1002/jnr.10053
- Chien, D.T., Szardenings, A.K., Bahri, S., Walsh, J.C., Mu, F., Xia, C., Shankle, W.R., Lerner, A.J., Su, M.-Y., Elizarov, A., Kolb, H.C., 2014. Early clinical PET imaging results with the novel PHF-tau radioligand [F18]-T808. *J. Alzheimers Dis. JAD* 38, 171–184. doi:10.3233/JAD-130098
- Chiu, K.-M., Lin, T.-Y., Lu, C.-W., Wang, S.-J., 2011. Inhibitory effect of glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals by α 2 adrenoceptor agonist dexmedetomidine. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 137–147. doi : 10.1016/j.ejphar.2011.08.012

- Cho, J.-H., Johnson, G.V.W., 2003. Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J. Biol. Chem.* 278, 187–193. doi:10.1074/jbc.M206236200
- Choi, H.B., Gordon, G.R.J., Zhou, N., Tai, C., Rungta, R.L., Martinez, J., Milner, T.A., Ryu, J.K., McLarnon, J.G., Tresguerres, M., Levin, L.R., Buck, J., MacVicar, B.A., 2012. Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron* 75, 1094–1104. doi : 10.1016/j.neuron.2012.08.032
- Choi, I.-Y., Seaquist, E.R., Gruetter, R., 2003. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J. Neurosci. Res.* 72, 25–32. doi : 10.1002/jnr.10574
- Cholet, N., Pellerin, L., Welker, E., Lacombe, P., Seylaz, J., Magistretti, P., Bonvento, G., 2001. Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 404–412. doi:10.1097/00004647-200104000-00009
- Christophe, E., 2005. Two Populations of Layer V Pyramidal Cells of the Mouse Neocortex: Development and Sensitivity to Anesthetics. *J. Neurophysiol.* 94, 3357–3367. doi : 10.1152/jn.00076.2005
- Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E.A., Buzsáki, G., 2010. Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 15298–15303. doi:10.1523/JNEUROSCI.0762-10.2010
- Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Kemper, T., Morgane, P.J., 1982. Nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 247, 17–28.
- Claustre, Y., Leonetti, M., Santucci, V., Bougault, I., Desvignes, C., Rouquier, L., Aubin, N., Keane, P., Busch, S., Chen, Y., Palejwala, V., Tocci, M., Yamdagni, P., Didier, M., Avenet, P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., Scatton, B., Steinberg, R., 2008. Effects of the beta3-adrenoceptor (Adrb3) agonist SR58611A (amibegron) on serotonergic and noradrenergic transmission in the rodent: relevance to its antidepressant/anxiolytic-like profile. *Neuroscience* 156, 353–364. doi : 10.1016/j.neuroscience.2008.07.011
- Cliburn, R.A., Dunn, A.R., Stout, K.A., Hoffman, C.A., Lohr, K.M., Bernstein, A.I., Winokur, E.J., Burkett, J., Schmitz, Y., Caudle, W.M., Miller, G.W., 2016. Immunochemical localization of vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in mouse brain. *J. Chem. Neuroanat.* doi : 10.1016/j.jchemneu.2016.11.003
- Cohen, A.D., Klunk, W.E., 2014. Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiol. Dis.* 72 Pt A, 117–122. doi : 10.1016/j.nbd.2014.05.001
- Cohen, D.M., Wei, J., O'Brian Smith, E., Gao, X., Quast, M.J., Sokoloff, L., 2002. A method for measuring cerebral glucose metabolism in vivo by ¹³C-NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 48, 1063–1067. doi:10.1002/mrm.10284
- Connelly, A., Jackson, G.D., Duncan, J.S., King, M.D., Gadian, D.G., 1994. Magnetic resonance spectroscopy in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 44, 1411–1417.
- Connors, B.W., Bear, M.F., Paradiso, M.A., 1997. *Neurosciences : à la découverte du cerveau* (A. Nieoullon, Trans. Paris: Pradel.
- Connors, B.W., Gutnick, M.J., 1990. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13, 99–104.
- Constantinople, C.M., Bruno, R.M., 2011. Effects and mechanisms of wakefulness on local cortical networks. *Neuron* 69, 1061–1068. doi : 10.1016/j.neuron.2011.02.040
- Cooper, G.M., 2000. *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edn. The Cell: A Molecular Approach. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Costa Leite, T., Da Silva, D., Guimarães Coelho, R., Zancan, P., Sola-Penna, M., 2007. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem. J.* 408, 123–130. doi:10.1042/BJ20070687
- Cotecchia, S., 2010. The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 30, 410–419. doi:10.3109/10799893.2010.518152
- Coull, J.T., Büchel, C., Friston, K.J., Frith, C.D., 1999. Noradrenergically mediated plasticity in a human attentional neuronal network. *NeuroImage* 10, 705–715. doi:10.1006/nimg.1999.0513
- Craig-Schapiro, R., Perrin, R.J., Roe, C.M., Xiong, C., Carter, D., Cairns, N.J., Mintun, M.A., Peskind, E.R., Li, G., Galasko, D.R., Clark, C.M., Quinn, J.F., D'Angelo, G., Malone, J.P., Townsend, R.R., Morris, J.C., Fagan, A.M., Holtzman, D.M., 2010. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 68, 903–912. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.08.025
- Cremer, J.E., Heath, D.F., 1974. The estimation of rates of utilization of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data. *Biochem. J.* 142, 527–544.

- Cruz, N.F., Diemel, G.A., 2002. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 1476–1489. doi : 10.1097/01.WCB.0000034362.37277.C0
- Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S., Castellano, A., Pifferi, F., Bocti, C., Paquet, N., Begdouri, H., Bentourkia, M., Turcotte, E., Allard, M., Barberger-Gateau, P., Fulop, T., Rapoport, S.I., 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 27, 3–20. doi : 10.1016/j.nut.2010.07.021
- da-Silva, W.S., Gómez-Puyou, A., de Gómez-Puyou, M.T., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F.G., de Meis, L., Oliveira, M.F., Galina, A., 2004. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 39846–39855. doi:10.1074/jbc.M403835200
- Dahlstrom, A., Fuxe, K., 1964. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol. Scand. Suppl. SUPPL 232*:1-55.
- Dale, H.H., 1906. On some physiological actions of ergot. *J. Physiol.* 34, 163–206.
- Dan, Y., Poo, M.-M., 2006. Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception. *Physiol. Rev.* 86, 1033–1048. doi:10.1152/physrev.00030.2005
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
- David, D.C., Hauptmann, S., Scherping, I., Schuessel, K., Keil, U., Rizzu, P., Ravid, R., Dröse, S., Brandt, U., Müller, W.E., Eckert, A., Götz, J., 2005. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280, 23802–23814. doi:10.1074/jbc.M500356200
- Daws, L.C., 2009. Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol. Ther.* 121, 89–99. doi : 10.1016/j.pharmthera.2008.10.004
- Day, H.E., Campeau, S., Watson, S.J., Akil, H., 1997. Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 13, 115–139.
- de Barry, J., Vincendon, G., Gombos, G., 1983. Uptake and metabolism of L-[3H] glutamate and L-[3H] glutamine in adult rat cerebellar slices. *Neurochem. Res.* 8, 1321–1335.
- de Leon, M.J., Ferris, S.H., George, A.E., Christman, D.R., Fowler, J.S., Gentes, C., Reisberg, B., Gee, B., Emmerich, M., Yonekura, Y., Brodie, J., Kricheff, I.I., Wolf, A.P., 1983. Positron emission tomographic studies of aging and Alzheimer disease. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 4, 568–571.
- de Lores Arnaiz, G.R., Ordieres, M.G.L., 2014. Brain Na (+), K (+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 10, 85–102.
- De Meyer, G., Shapiro, F., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Coart, E., Hansson, O., Minthon, L., Zetterberg, H., Blennow, K., Shaw, L., Trojanowski, J.Q., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Arch. Neurol.* 67, 949–956. doi:10.1001/archneurol.2010.179
- DeCarli, C., 2003. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. *Lancet Neurol.* 2, 15–21.
- DeFelipe, J., Fariñas, I., 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563–607.
- Del Sole, A., Malaspina, S., Magenta Biasina, A., 2016. Magnetic resonance imaging and positron emission tomography in the diagnosis of neurodegenerative dementias. *Funct. Neurol.* 31, 205–215.
- Delgado-Esteban, M., Almeida, A., Bolaños, J.P., 2000. D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *J. Neurochem.* 75, 1618–1624.
- Delmas, P., Coste, B., Gamper, N., Shapiro, M.S., 2005. Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for calcium channel modulation. *Neuron* 47, 179–182. doi : 10.1016/j.neuron.2005.07.001
- Denic, A., Macura, S.I., Mishra, P., Gamez, J.D., Rodriguez, M., Pirko, I., 2011. MRI in rodent models of brain disorders. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 8, 3–18. doi:10.1007/s13311-010-0002-4
- Descarries, L., Bérubé-Carrière, N., Riad, M., Bo, G.D., Mendez, J.A., Trudeau, L.-E., 2008. Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res. Rev.* 58, 290–302. doi : 10.1016/j.brainresrev.2007.10.005
- Deuschle, K., Fehr, M., Hilpert, M., Lager, I., Lalonde, S., Looger, L.L., Okumoto, S., Persson, J., Schmidt, A., Frommer, W.B., 2005a. Genetically encoded sensors for metabolites. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 64, 3–9. doi:10.1002/cyto.a.20119

- Deuschle, K., Okumoto, S., Fehr, M., Looger, L.L., Kozhukh, L., Frommer, W.B., 2005b. Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 14, 2304–2314. doi:10.1110/ps.051508105
- Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., Anandatheerthavarada, H.K., 2006. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 9057–9068. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006
- Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D., Carafoli, E., 2008. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 65–74. doi : 10.1016/j.abb.2008.02.026
- Diaz-Hernandez, J.I., Almeida, A., Delgado-Esteban, M., Fernandez, E., Bolaños, J.P., 2005. Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 38992–39001. doi:10.1074/jbc.M507065200
- Dickerson, B.C., Wolk, D.A., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2012. MRI cortical thickness biomarker predicts AD-like CSF and cognitive decline in normal adults. *Neurology* 78, 84–90. doi: 10.1212/WNL.0b013e31823efc6c
- Dienel, G.A., Cruz, N.F., 2004. Nutrition during brain activation: does cell-to-cell lactate shuttling contribute significantly to sweet and sour food for thought? *Neurochem. Int.* 45, 321–351. doi : 10.1016/j.neuint.2003.10.011
- Dienel, G.A., Hertz, L., 2001. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J. Neurosci. Res.* 66, 824–838. doi:10.1002/jnr.10079
- Ding, F., Yao, J., Rettberg, J.R., Chen, S., Brinton, R.D., 2013. Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for bioenergetic intervention. *PLoS One* 8, e79977. doi : 10.1371/journal.pone.0079977
- Dittrich, L., Heiss, J.E., Warriar, D.R., Perez, X.A., Quik, M., Kilduff, T.S., 2012. Cortical nNOS neurons co-express the NK1 receptor and are depolarized by Substance P in multiple mammalian species. *Front. Neural Circuits* 6, 31. doi:10.3389/fncir.2012.00031
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D., 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75–79. doi:10.1038/321075a0
- Dotz, H.U., Pawelzik, H., Zieglgänsberger, W., 1991. Actions of noradrenaline on neocortical neurons in vitro. *Brain Res.* 545, 307–311.
- Dotz, H.U., Zieglgänsberger, W., 1998. Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared videomicroscopy. *Histochem. J.* 30, 141–152.
- Doucette, W., Milder, J., Restrepo, D., 2007. Adrenergic modulation of olfactory bulb circuitry affects odor discrimination. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 14, 539–547. doi:10.1101/lm.606407
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62, 649–671.
- Dringen, R., Gebhardt, R., Hamprecht, B., 1993a. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 623, 208–214.
- Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J., Hamprecht, B., 1999. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J. Neurochem.* 72, 2523–2530.
- Dringen, R., Wiesinger, H., Hamprecht, B., 1993b. Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons. *Neurosci. Lett.* 163, 5–7.
- Driver, A.S., Kodavanti, P.R., Mundy, W.R., 2000. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 175–181.
- Drobac, E., Tricoire, L., Chaffotte, A.-F., Guiot, E., Lambolze, B., 2010. Calcium imaging in single neurons from brain slices using bioluminescent reporters. *J. Neurosci. Res.* 88, 695–711. doi:10.1002/jnr.22249
- Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkenstin, J.D., Gunn-Moore, F.J., Vonsattel, J.P., Arancio, O., Chen, J.X., Yan, S.D., 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 14, 1097–1105. doi:10.1038/nm.1868

- Duan, H., Wang, J., 2010. Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335, 743–753. doi:10.1124/jpet.110.170142
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J.L., Blennow, K., DeKosky, S.T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G.B., Fox, N.C., Galasko, D., Habert, M.-O., Jicha, G.A., Nordberg, A., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M., Epelbaum, S., de Souza, L.C., Vellas, B., Visser, P.J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P., Cummings, J.L., 2014. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 13, 614–629. doi:10.1016/S1474-4422(14)70090-0
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavedo, E., Crutch, S., Dartigues, J.-F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A.A., Habert, M.-O., Holtzman, D.M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J.-L., O'Bryant, S.E., Rabinovici, G.D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L.S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M.C., Cummings, J., Jack, C.R., Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of AD"; July 23, 2015; Washington DC, USA, 2016a. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 12, 292–323. doi : 10.1016/j.jalz.2016.02.002
- Dubois, B., Padovani, A., Scheltens, P., Rossi, A., Dell'Agnello, G., 2016b. Timely Diagnosis for Alzheimer's Disease : A Literature Review on Benefits and Challenges. *J. Alzheimers Dis. JAD* 49, 617–631. doi:10.3233/JAD-150692
- Duchemin, S., Boily, M., Sadekova, N., Girouard, H., 2012. The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation. *Front. Neural Circuits* 6, 51. doi:10.3389/fncir.2012.00051
- Duelli, R., Kuschinsky, W., 2001. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 16, 71–76.
- Duran, J., Tevy, M.F., Garcia-Rocha, M., Calbó, J., Milán, M., Guinovart, J.J., 2012. Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice. *EMBO Mol. Med.* 4, 719–729. doi:10.1002/emmm.201200241
- Ebert, D., Haller, R.G., Walton, M.E., 2003. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5928–5935.
- Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., Takahashi, T., 1989. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* 414, 600–612.
- Eggleston, L.V., Krebs, H.A., 1974. Regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochem. J.* 138, 425–435.
- Eisenhofer, G., Esler, M.D., Meredith, I.T., Dart, A., Cannon, R.O., Quyyumi, A.A., Lambert, G., Chin, J., Jennings, G.L., Goldstein, D.S., 1992. Sympathetic nervous function in human heart as assessed by cardiac spillovers of dihydroxyphenylglycol and norepinephrine. *Circulation* 85, 1775–1785.
- Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 2004. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.* 56, 331–349. doi:10.1124/pr.56.3.1
- Engl, E., Attwell, D., 2015. Non-signalling energy use in the brain. *J. Physiol.* 593, 3417–3429. doi:10.1113/jphysiol.2014.282517
- Erecińska, M., Silver, I.A., 1989. ATP and brain function. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 2–19. doi:10.1038/jcbfm.1989.2
- Erlichman, J.S., Hewitt, A., Damon, T.L., Hart, M., Kuraszcz, J., Li, A., Leiter, J.C., 2008. Inhibition of monocarboxylate transporter 2 in the retrotrapezoid nucleus in rats: a test of the astrocyte-neuron lactate-shuttle hypothesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 4888–4896. doi:10.1523/JNEUROSCI.5430-07.2008
- Evans, B.A., Sato, M., Sarwar, M., Hutchinson, D.S., Summers, R.J., 2010. Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 159, 1022–1038. doi : 10.1111/j.1476-5381.2009.00602.x
- Faber, E.S.L., Sah, P., 2002. Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1618–1628.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., van Duijn, C.M., 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta-Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349–1356.
- Fawver, J.N., Schall, H.E., Petrofes Chapa, R.D., Zhu, X., Murray, I.V.J., 2012. Amyloid-β metabolite sensing: biochemical linking of glycation modification and misfolding. *J. Alzheimers Dis. JAD* 30, 63–73. doi:10.3233/JAD-2012-112114

- Ferry, B., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 1999. Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol. Psychiatry* 46, 1140–1152.
- Fleisher, A.S., Chen, K., Liu, X., Roontiva, A., Thiyyagura, P., Ayutyanont, N., Joshi, A.D., Clark, C.M., Mintun, M.A., Pontecorvo, M.J., Doraiswamy, P.M., Johnson, K.A., Skovronsky, D.M., Reiman, E.M., 2011. Using positron emission tomography and florbetapir F18 to image cortical amyloid in patients with mild cognitive impairment or dementia due to Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 68, 1404–1411. doi:10.1001/archneurol.2011.150
- Fleisher, A.S., Chen, K., Quiroz, Y.T., Jakimovich, L.J., Gomez, M.G., Langois, C.M., Langbaum, J.B.S., Ayutyanont, N., Roontiva, A., Thiyyagura, P., Lee, W., Mo, H., Lopez, L., Moreno, S., Acosta-Baena, N., Giraldo, M., Garcia, G., Reiman, R.A., Huentelman, M.J., Kosik, K.S., Tariot, P.N., Lopera, F., Reiman, E.M., 2012. Florbetapir PET analysis of amyloid- β deposition in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer's disease kindred: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 11, 1057–1065. doi:10.1016/S1474-4422(12)70227-2
- Fleming, T., Rabbani, N., Thornalley, P.J., 2008. Preparation of nucleotide advanced glycation endproducts--imidazopurinone adducts formed by glycation of deoxyguanosine with glyoxal and methylglyoxal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1126, 280–282. doi:10.1196/annals.1433.037
- Flügge, G., Van Kampen, M., Mijster, M.J., 2004. Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tissue Res.* 315, 1–14. doi:10.1007/s00441-003-0807-0
- Fodero-Tavoletti, M.T., Okamura, N., Furumoto, S., Mulligan, R.S., Connor, A.R., McLean, C.A., Cao, D., Rigopoulos, A., Cartwright, G.A., O'Keefe, G., Gong, S., Adlard, P.A., Barnham, K.J., Rowe, C.C., Masters, C.L., Kudo, Y., Cappai, R., Yanai, K., Villemagne, V.L., 2011. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 134, 1089–1100. doi:10.1093/brain/awr038
- Foehring, R.C., Schwindt, P.C., Crill, W.E., 1989. Norepinephrine selectively reduces slow Ca²⁺- and Na⁺-mediated K⁺ currents in cat neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 61, 245–256.
- Foote, S.L., Freedman, R., Oliver, A.P., 1975. Effects of putative neurotransmitters on neuronal activity in monkey auditory cortex. *Brain Res.* 86, 229–242.
- Foote, S.L., Morrison, J.H., 1987. Extrathalamic modulation of cortical function. *Annu. Rev. Neurosci.* 10, 67–95. doi:10.1146/annurev.ne.10.030187.000435
- Forsberg, A., Engler, H., Almkvist, O., Blomquist, G., Hagman, G., Wall, A., Ringheim, A., Långström, B., Nordberg, A., 2008. PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 29, 1456–1465. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.029
- Fox, M.D., Raichle, M.E., 2007. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 700–711. doi : 10.1038/nrn2201
- Fox, P.T., Raichle, M.E., 1986. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1140–1144.
- Fox, P.T., Raichle, M.E., Mintun, M.A., Dence, C., 1988. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241, 462–464.
- Frederikse, P.H., Garland, D., Zigler, J.S., Piatigorsky, J., 1996. Oxidative stress increases production of beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid (A β) in mammalian lenses, and A β has toxic effects on lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 10169–10174.
- Fribourg, M., Moreno, J.L., Holloway, T., Provasi, D., Baki, L., Mahajan, R., Park, G., Adney, S.K., Hatcher, C., Eltit, J.M., Ruta, J.D., Albizu, L., Li, Z., Umali, A., Shim, J., Fabiato, A., MacKerell, A.D., Brezina, V., Sealson, S.C., Filizola, M., González-Maeso, J., Logothetis, D.E., 2011. Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell* 147, 1011–1023. doi : 10.1016/j.cell.2011.09.055
- Friedland, R.P., Budinger, T.F., Ganz, E., Yano, Y., Mathis, C.A., Koss, B., Ober, B.A., Huesman, R.H., Derenzo, S.E., 1983. Regional cerebral metabolic alterations in dementia of the Alzheimer type: positron emission tomography with [18F] fluorodeoxyglucose. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 7, 590–598.
- Frisoni, G.B., Prestia, A., Rasser, P.E., Bonetti, M., Thompson, P.M., 2009. In vivo mapping of incremental cortical atrophy from incipient to overt Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 256, 916–924. doi : 10.1007/s00415-009-5040-7
- Fumagalli, S., Perego, C., Pischiutta, F., Zanier, E.R., De Simoni, M.-G., 2015. The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front. Neurol.* 6, 81. doi:10.3389/fneur.2015.00081
- Fuxe, K., Tarakanov, A., Romero Fernandez, W., Ferraro, L., Tanganelli, S., Filip, M., Agnati, L.F., Garriga, P., Diaz-Cabiale, Z., Borroto-Escuela, D.O., 2014. Diversity and Bias through Receptor-Receptor

- Interactions in GPCR Heteroreceptor Complexes. Focus on Examples from Dopamine D2 Receptor Heteromerization. *Front. Endocrinol.* 5, 71. doi:10.3389/fendo.2014.00071
- Gabbott, P.L., Somogyi, P., 1986. Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in the visual cortex (area 17) of the cat. *Exp. Brain Res.* 61, 323–331.
- Galarreta, M., Erdélyi, F., Szabó, G., Hestrin, S., 2004. Electrical coupling among irregular-spiking GABAergic interneurons expressing cannabinoid receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9770–9778. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3027-04.2004
- Gallopin, T., Luppi, P.-H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambollez, B., Fort, P., 2005. The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* 134, 1377–1390. doi : 10.1016/j.neuroscience.2005.05.045
- Gambhir, S.S., 2002. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer* 2, 683–693. doi : 10.1038/nrc882
- García-Nogales, P., Almeida, A., Bolaños, J.P., 2003. Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *J. Biol. Chem.* 278, 864–874. doi:10.1074/jbc.M206835200
- García-Nogales, P., Almeida, A., Fernández, E., Medina, J.M., Bolaños, J.P., 1999. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 72, 1750–1758.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385–388. doi:10.1038/336385a0
- Gaspar, P., Berger, B., Febvret, A., Vigny, A., Henry, J.P., 1989. Catecholamine innervation of the human cerebral cortex as revealed by comparative immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase. *J. Comp. Neurol.* 279, 249–271. doi:10.1002/cne.902790208
- Gasser, P.J., Hurley, M.M., Chan, J., Pickel, V.M., 2017. Organic cation transporter 3 (OCT3) is localized to intracellular and surface membranes in select glial and neuronal cells within the basolateral amygdaloid complex of both rats and mice. *Brain Struct. Funct.* 222, 1913–1928. doi : 10.1007/s00429-016-1315-9
- Gatta, E., Lefebvre, T., Gaetani, S., dos Santos, M., Marrocco, J., Mir, A.-M., Cassano, T., Maccari, S., Nicoletti, F., Mairesse, J., 2016. Evidence for an imbalance between tau O-GlcNAcylation and phosphorylation in the hippocampus of a mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* 105, 186–197. doi : 10.1016/j.phrs.2016.01.006
- Gelinas, J.N., Tenorio, G., Lemon, N., Abel, T., Nguyen, P.V., 2008. Beta-adrenergic receptor activation during distinct patterns of stimulation critically modulates the PKA-dependence of LTP in the mouse hippocampus. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 15, 281–289. doi:10.1101/lm.829208
- Gerashchenko, D., Wisor, J.P., Burns, D., Reh, R.K., Shiromani, P.J., Sakurai, T., de la Iglesia, H.O., Kilduff, T.S., 2008. Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10227–10232. doi:10.1073/pnas.0803125105
- Gerhart, D.Z., Leino, R.L., Borson, N.D., Taylor, W.E., Gronlund, K.M., McCall, A.L., Drewes, L.R., 1995. Localization of glucose transporter GLUT 3 in brain: comparison of rodent and dog using species-specific carboxyl-terminal antisera. *Neuroscience* 66, 237–246.
- Gerhart, D.Z., Leino, R.L., Taylor, W.E., Borson, N.D., Drewes, L.R., 1994. GLUT1 and GLUT3 gene expression in gerbil brain following brief ischemia: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 25, 313–322.
- Gerhart, D.Z., LeVasseur, R.J., Broderius, M.A., Drewes, L.R., 1989. Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J. Neurosci. Res.* 22, 464–472. doi : 10.1002/jnr.490220413
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., Rouach, N., 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 87–99. doi:10.1038/nrn2757
- Gibson, G.E., Blass, J.P., 2007. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1605–1619. doi:10.1089/ars.2007.1766
- Gibson, G.E., Sheu, K.F., Blass, J.P., Baker, A., Carlson, K.C., Harding, B., Perrino, P., 1988. Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 45, 836–840.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845. doi : 10.1126/science.1194637

- Gjedde, A., Hansen, A.J., Siemkowicz, E., 1980. Rapid simultaneous determination of regional blood flow and blood-brain glucose transfer in brain of rat. *Acta Physiol. Scand.* 108, 321–330. doi : 10.1111/j.1748-1716.1980.tb06540.x
- Gleichmann, M., Collis, L.P., Smith, P.J.S., Mattson, M.P., 2009. Simultaneous single neuron recording of O₂ consumption, [Ca²⁺]_i and mitochondrial membrane potential in glutamate toxicity. *J. Neurochem.* 109, 644–655. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05997.x
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., Crowther, R.A., 1992. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168.
- Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M., Creager, M.A., 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114, 597–605. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854
- Golgi, C., 1886. Sulla infezione malarica. Vincenzo Bona.
- Gordon, B.A., Friedrichsen, K., Brier, M., Blazey, T., Su, Y., Christensen, J., Aldea, P., McConathy, J., Holtzman, D.M., Cairns, N.J., Morris, J.C., Fagan, A.M., Ances, B.M., Benzinger, T.L.S., 2016. The relationship between cerebrospinal fluid markers of Alzheimer pathology and positron emission tomography tau imaging. *Brain* 139, 2249–2260. doi:10.1093/brain/aww139
- Gordon, G.R.J., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C.R., MacVicar, B.A., 2008. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745–749. doi:10.1038/nature07525
- Gould, G.W., Bell, G.I., 1990. Facilitative glucose transporters: an expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 15, 18–23.
- Gozes, I., 2010. Tau pathology and future therapeutics. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 685–696.
- Graham, G.D., Blamire, A.M., Rothman, D.L., Brass, L.M., Fayad, P.B., Petroff, O.A., Prichard, J.W., 1993. Early temporal variation of cerebral metabolites after human stroke. A proton magnetic resonance spectroscopy study. *Stroke* 24, 1891–1896.
- Gravitz, L., 2011. Drugs: a tangled web of targets. *Nature* 475, S9-11. doi:10.1038/475S9a
- Grillo, C.A., Pirolli, G.G., Hendry, R.M., Reagan, L.P., 2009. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* 1296, 35–45. doi : 10.1016/j.brainres.2009.08.005
- Gruetter, R., 2002. In vivo ¹³C NMR studies of compartmentalized cerebral carbohydrate metabolism. *Neurochem. Int.* 41, 143–154.
- Gruetter, R., Seaquist, E.R., Kim, S., Ugurbil, K., 1998. Localized in vivo ¹³C-NMR of glutamate metabolism in the human brain: initial results at 4 tesla. *Dev. Neurosci.* 20, 380–388.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917.
- Guan, D., Armstrong, W.E., Foehring, R.C., 2015. Electrophysiological properties of genetically identified subtypes of layer 5 neocortical pyramidal neurons: Ca²⁺ dependence and differential modulation by norepinephrine. *J. Neurophysiol.* 113, 2014–2032. doi:10.1152/jn.00524.2014
- Gulledge, A.T., Park, S.B., Kawaguchi, Y., Stuart, G.J., 2007. Heterogeneity of phasic cholinergic signaling in neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 97, 2215–2229. doi:10.1152/jn.00493.2006
- Gulyás, A.I., Buzsáki, G., Freund, T.F., Hirase, H., 2006. Populations of hippocampal inhibitory neurons express different levels of cytochrome c. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2581–2594. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04814.x
- Hague, C., Uberti, M.A., Chen, Z., Hall, R.A., Minneman, K.P., 2004. Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 15541–15549. doi:10.1074/jbc.M314014200
- Haj-Dahmane, S., Andrade, R., 1998. Ionic mechanism of the slow afterdepolarization induced by muscarinic receptor activation in rat prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.* 80, 1197–1210.
- Hajós, F., Garthwaite, G., Garthwaite, J., 1986. Reversible and irreversible neuronal damage caused by excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 18, 417–436.
- Halestrap, A.P., Price, N.T., 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 343 Pt 2, 281–299.
- Hamano, T., Gendron, T.F., Causevic, E., Yen, S.-H., Lin, W.-L., Isidoro, C., Deture, M., Ko, L., 2008. Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1119–1130. doi : 10.1111/j.1460-9568.2008.06084.x

- Hamberger, A., Hyden, H., 1963. Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J. Cell Biol.* 16, 521–525.
- Hane, F.T., Robinson, M., Lee, B.Y., Bai, O., Leonenko, Z., Albert, M.S., 2017. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *J. Alzheimers Dis. JAD* 57, 645–665. doi:10.3233/JAD-160907
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889. doi:10.1038/nature04724
- Harden, A., Young, W.J., 1906. The alcoholic ferment of yeast-juice. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 77, 405–420.
- Hardy, J., Bogdanovic, N., Winblad, B., Portelius, E., Andreassen, N., Cedazo-Minguez, A., Zetterberg, H., 2014. Pathways to Alzheimer's disease. *J. Intern. Med.* 275, 296–303.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356. doi:10.1126/science.1072994
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Harley, C.W., 1987. A role for norepinephrine in arousal, emotion and learning? limbic modulation by norepinephrine and the Kety hypothesis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 11, 419–458.
- Harr, S.D., Simonian, N.A., Hyman, B.T., 1995. Functional alterations in Alzheimer's disease: decreased glucose transporter 3 immunoreactivity in the perforant pathway terminal zone. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 38–41.
- Harris, J.J., Attwell, D., 2012. The energetics of CNS white matter. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 356–371. doi:10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012
- Harris, J.J., Jolivet, R., Attwell, D., 2012. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75, 762–777. doi : 10.1016/j.neuron.2012.08.019
- Hatashita, S., Yamasaki, H., 2010. Clinically different stages of Alzheimer's disease associated by amyloid deposition with [11C]-PIB PET imaging. *J. Alzheimers Dis. JAD* 21, 995–1003. doi:10.3233/JAD-2010-100222
- Havekes, R., Canton, D.A., Park, A.J., Huang, T., Nie, T., Day, J.P., Guercio, L.A., Grimes, Q., Luczak, V., Gelman, I.H., Baillie, G.S., Scott, J.D., Abel, T., 2012. Gravin orchestrates protein kinase A and β 2-adrenergic receptor signaling critical for synaptic plasticity and memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 18137–18149. doi:10.1523/JNEUROSCI.3612-12.2012
- He, C., Chen, F., Li, B., Hu, Z., 2014. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog. Neurobiol.* 112, 1–23. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.001
- Heales, S.J.R., Bolaños, J.P., 2002. Impairment of brain mitochondrial function by reactive nitrogen species: the role of glutathione in dictating susceptibility. *Neurochem. Int.* 40, 469–474.
- Henry, P.-G., Criego, A.B., Kumar, A., Seaquist, E.R., 2010. Measurement of cerebral oxidative glucose consumption in patients with type 1 diabetes mellitus and hypoglycemia unawareness using (13) C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolism.* 59, 100–106. doi : 10.1016/j.metabol.2009.07.012
- Henry, P.-G., Lebon, V., Vaufrey, F., Brouillet, E., Hantraye, P., Bloch, G., 2002. Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo 1H-[13C] NMR spectroscopy. *J. Neurochem.* 82, 857–866.
- Herholz, K., 2010. Cerebral glucose metabolism in preclinical and prodromal Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* 10, 1667–1673. doi:10.1586/ern.10.136
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., Bolaños, J.P., 2009. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* 11, 747–752. doi:10.1038/ncb1881
- Herrup, K., 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* 18, 794–799. doi:10.1038/nn.4017
- Hertz, L., Lovatt, D., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2010. Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca (2+)] i. *Neurochem. Int.* 57, 411–420. doi : 10.1016/j.neuint.2010.03.019
- Hertz, L., Peng, L., Dienel, G.A., 2007. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 219–249. doi : 10.1038/sj.jcbfm.9600343
- Higo, S., Akashi, K., Sakimura, K., Tamamaki, N., 2009. Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Front. Neuroanat.* 3, 25. doi : 10.3389/neuro.05.025.2009
- Higo, S., Udaka, N., Tamamaki, N., 2007. Long-range GABAergic projection neurons in the cat neocortex. *J. Comp. Neurol.* 503, 421–431. doi:10.1002/cne.21395

- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A.D., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Jones, P.K., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2001. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 3017–3023.
- Hof, P.R., Pascale, E., Magistretti, P.J., 1988. K⁺ at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca²⁺-dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 8, 1922–1928.
- Hoffman, J.M., Welsh-Bohmer, K.A., Hanson, M., Crain, B., Hulette, C., Earl, N., Coleman, R.E., 2000. FDG PET imaging in patients with pathologically verified dementia. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 41, 1920–1928.
- Hoffmann, C., Zürn, A., Bünemann, M., Lohse, M.J., 2008. Conformational changes in G-protein-coupled receptors—the quest for functionally selective conformations is open. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S358–366. doi: 10.1038/sj.bjp.0707615
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R.W., Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., Zotova, E., Nicoll, J.A.R., 2008. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet Lond. Engl.* 372, 216–223. doi:10.1016/S0140-6736(08)61075-2
- Holmgren, E., 1901. Über Systeme von linearen partiellen Differentialgleichungen. *Öfversigt Af Kongl Vetensk. -Akad Förh* 58, 91–105.
- Honarnejad, K., Daschner, A., Giese, A., Zall, A., Schmidt, B., Szybinska, A., Kuznicki, J., Herms, J., 2013. Development and implementation of a high-throughput compound screening assay for targeting disrupted ER calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *PloS One* 8, e80645. doi : 10.1371/journal.pone.0080645
- Hooijmans, C.R., Graven, C., Dederen, P.J., Tanila, H., van Groen, T., Kiliaan, A.J., 2007. Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice. *Brain Res.* 1181, 93–103. doi : 10.1016/j.brainres.2007.08.063
- Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 104, 1433–1439. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x
- Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S.F., Avila, J., Lucas, J.J., Giese, K.P., Stephenson, J., Lovestone, S., 2007. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.* 25, 81–86. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05245.x
- Horikoshi, Y., Sasaki, A., Taguchi, N., Maeda, M., Tsukagoshi, H., Sato, K., Yamaguchi, H., 2003. Human GLUT5 immunolabeling is useful for evaluating microglial status in neuropathological study using paraffin sections. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 105, 157–162. doi:10.1007/s00401-002-0627-4
- Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T., Imahori, K., 1996. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2719–2723.
- Hostetler, E.D., Walji, A.M., Zeng, Z., Miller, P., Bennacef, I., Salinas, C., Connolly, B., Gantert, L., Haley, H., Holahan, M., Purcell, M., Riffel, K., Lohith, T.G., Coleman, P., Soriano, A., Ogawa, A., Xu, S., Zhang, X., Joshi, E., Della Rocca, J., Hesk, D., Schenk, D.J., Evelhoch, J.L., 2016. Preclinical Characterization of 18F-MK-6240, a Promising PET Tracer for In Vivo Quantification of Human Neurofibrillary Tangles. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 57, 1599–1606. doi:10.2967/jnumed.115.171678
- Hou, B.-H., Takanaga, H., Grossmann, G., Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Jones, A.M., Lalonde, S., Schweissgut, O., Wiechert, W., Frommer, W.B., 2011. Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. *Nat. Protoc.* 6, 1818–1833. doi:10.1038/nprot.2011.392
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., Giaume, C., 2008. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5207–5217. doi:10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008
- Houser, C.R., Hendry, S.H., Jones, E.G., Vaughn, J.E., 1983. Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J. Neurocytol.* 12, 617–638.
- Hu, B., Zhang, L.-P., Chen, M.-L., Chen, M.-L., Wang, J.-H., 2012. The inhibition of fluorescence resonance energy transfer between quantum dots for glucose assay. *Biosens. Bioelectron.* 32, 82–88. doi : 10.1016/j.bios.2011.11.031
- Hu, E., Demmou, L., Cauli, B., Gallopin, T., Geoffroy, H., Harris-Warrick, R.M., Paupardin-Tritsch, D., Lambolez, B., Vincent, P., Hepp, R., 2011. VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit

- different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb. Cortex* N. Y. N 1991 21, 708–718. doi:10.1093/cercor/bhq143
- Hu, H., Real, E., Takamiya, K., Kang, M.-G., Ledoux, J., Huganir, R.L., Malinow, R., 2007. Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell* 131, 160–173. doi : 10.1016/j.cell.2007.09.017
- Huang, S., Treviño, M., He, K., Ardiles, A., Pasquale, R. de, Guo, Y., Palacios, A., Huganir, R., Kirkwood, A., 2012. Pull-push neuromodulation of LTP and LTD enables bidirectional experience-induced synaptic scaling in visual cortex. *Neuron* 73, 497–510. doi : 10.1016/j.neuron.2011.11.023
- Huang, Z.J., Di Cristo, G., Ango, F., 2007. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 673–686. doi:10.1038/nrn2188
- Hurley, L.M., Devilbiss, D.M., Waterhouse, B.D., 2004. A matter of focus: monoaminergic modulation of stimulus coding in mammalian sensory networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 488–495. doi : 10.1016/j.conb.2004.06.007
- Hyden, H., 1959. Quantitative assay of compounds in isolated, fresh nerve cells and glial cells from control and stimulated animals. *Nature* 184, 433–435.
- Hyden, H., Lovtrup, S., Pigon, A., 1958. Cytochrome oxidase and succinoxidase activities in spinal ganglion cells and in glial capsule cells. *J. Neurochem.* 2, 304–311.
- Hydén, H., Rapallino, M.V., Cupello, A., 2000. Unraveling of important neurobiological mechanisms by the use of pure, fully differentiated neurons obtained from adult animals. *Prog. Neurobiol.* 60, 471–499.
- Hyder, F., Rothman, D.L., Mason, G.F., Rangarajan, A., Behar, K.L., Shulman, R.G., 1997. Oxidative glucose metabolism in rat brain during single forepaw stimulation: a spatially localized $^1\text{H}[^{13}\text{C}]$ nuclear magnetic resonance study. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 1040–1047. doi:10.1097/00004647-199710000-00005
- Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Neurochem. Int.* 45, 583–595. doi : 10.1016/j.neuint.2004.03.007
- Iadecola, C., 2014. Angiophagy: clearing or clogging microvessels? *Sci. Transl. Med.* 6, 226fs10. doi:10.1126/scitranslmed.3008667
- Iadecola, C., 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer’s disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347–360. doi:10.1038/nrn1387
- Iadecola, C., Nedergaard, M., 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10, 1369–1376. doi : 10.1038/nn2003
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., Ogawara, M., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer’s disease. *J. Biochem. (Tokyo)* 99, 1807–1810.
- Imamura, H., Nhat, K.P.H., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., Noji, H., 2009. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15651–15656. doi:10.1073/pnas.0904764106
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., 2016. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 15–27. doi:10.1038/nrneurol.2015.225
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M.J., Kaufman, E., Sokoloff, L., 2003. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4879–4884. doi:10.1073/pnas.0831078100
- Ivanov, A., Mukhtarov, M., Bregestovski, P., Zilberter, Y., 2011. Lactate Effectively Covers Energy Demands during Neuronal Network Activity in Neonatal Hippocampal Slices. *Front. Neuroenergetics* 3, 2. doi:10.3389/fnene.2011.00002
- Jack, C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Weiner, M.W., Aisen, P.S., Shaw, L.M., Vemuri, P., Wiste, H.J., Weigand, S.D., Lesnick, T.G., Pankratz, V.S., Donohue, M.C., Trojanowski, J.Q., 2013. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer’s disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* 12, 207–216. doi:10.1016/S1474-4422(12)70291-0
- Jack, C.R., Lowe, V.J., Senjem, M.L., Weigand, S.D., Kemp, B.J., Shiung, M.M., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Petersen, R.C., 2008. ^{11}C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer’s disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain J. Neurol.* 131, 665–680. doi:10.1093/brain/awm336
- Jack, C.R., Wiste, H.J., Vemuri, P., Weigand, S.D., Senjem, M.L., Zeng, G., Bernstein, M.A., Gunter, J.L., Pankratz, V.S., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Knopman, D.S., Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer’s disease. *Brain J. Neurol.* 133, 3336–3348. doi:10.1093/brain/awq277

- Jaeger, P.A., Pickford, F., Sun, C.-H., Lucin, K.M., Masliah, E., Wyss-Coray, T., 2010. Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One* 5, e11102. doi : 10.1371/journal.pone.0011102
- Jansen, W.J., et al., 2015. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA* 313, 1924–1938. doi:10.1001/jama.2015.4668
- Jauhiainen, A.M., Kangasmaa, T., Rusanen, M., Niskanen, E., Tervo, S., Kivipelto, M., Vanninen, R.L., Kuikka, J.T., Soininen, H., 2008. Differential hypometabolism patterns according to mild cognitive impairment subtypes. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 26, 490–498. doi:10.1159/000167880
- Jaworska, A., Dzbek, J., Styczynska, M., Kuznicki, J., 2013. Analysis of calcium homeostasis in fresh lymphocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1692–1699. doi : 10.1016/j.bbamcr.2013.01.012
- Jaworski, T., Dewachter, I., Lechat, B., Gees, M., Kremer, A., Demedts, D., Borghgraef, P., Devijver, H., Kügler, S., Patel, S., Woodgett, J.R., Van Leuven, F., 2011. GSK-3 α/β kinases and amyloid production in vivo. *Nature* 480, E4–5; discussion E6. doi:10.1038/nature10615
- Jodo, E., Chiang, C., Aston-Jones, G., 1998. Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 83, 63–79.
- John, S.A., Ottolia, M., Weiss, J.N., Ribalet, B., 2008. Dynamic modulation of intracellular glucose imaged in single cells using a FRET-based glucose nanosensor. *Pflugers Arch.* 456, 307–322. doi:10.1007/s00424-007-0395-z
- Jonckers, E., Shah, D., Hamaide, J., Verhoye, M., Van der Linden, A., 2015. The power of using functional fMRI on small rodents to study brain pharmacology and disease. *Front. Pharmacol.* 6, 231. doi:10.3389/fphar.2015.00231
- Jones, B.E., Halaris, A.E., McIlhany, M., Moore, R.Y., 1977. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res.* 127, 1–21.
- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., Bonvento, G., 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23, 1–10.
- Kakimoto, A., Ito, S., Okada, H., Nishizawa, S., Minoshima, S., Ouchi, Y., 2016. Age-Related Sex-Specific Changes in Brain Metabolism and Morphology. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 57, 221–225. doi:10.2967/jnumed.115.166439
- Kalapos, M.P., 2008. Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23, 69–91.
- Kalaria, R.N., Harik, S.I., 1989a. Abnormalities of the glucose transporter at the blood-brain barrier and in brain in Alzheimer's disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* 317, 415–421.
- Kalaria, R.N., Harik, S.I., 1989b. Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 53, 1083–1088.
- Kanai, Y., 1997. Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 565–572.
- Kaneko, I., Yamada, N., Sakuraba, Y., Kamenosono, M., Tutumi, S., 1995. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. *J. Neurochem.* 65, 2585–2593.
- Karagiannis, A., Gallopin, T., Dávid, C., Battaglia, D., Geoffroy, H., Rossier, J., Hillman, E.M.C., Staiger, J.F., Cauli, B., 2009. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3642–3659. doi:10.1523/JNEUROSCI.0058-09.2009
- Karamanos, T.K., Kalverda, A.P., Thompson, G.S., Radford, S.E., 2015. Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 88–89, 86–104. doi : 10.1016/j.pnmrs.2015.05.002
- Kasischke, K.A., Vishwasrao, H.D., Fisher, P.J., Zipfel, W.R., Webb, W.W., 2004. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305, 99–103. doi:10.1126/science.1096485
- Kato, N., 1993. Mechanisms of beta-adrenergic facilitation of LTP in rat visual cortex. *Neuroreport* 4, 1087–1090.
- Kato, N., Artola, A., Singer, W., 1991. Developmental changes in the susceptibility to long-term potentiation of neurones in rat visual cortex slices. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 60, 43–50.
- Kawaguchi, Y., 1997. Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J. Neurophysiol.* 78, 1743–1747.
- Kawaguchi, Y., 1995. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 2638–2655.

- Kawaguchi, Y., 1993. Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* 69, 416–431.
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 7, 476–486.
- Kawaguchi, Y., Shindou, T., 1998. Noradrenergic excitation and inhibition of GABAergic cell types in rat frontal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 6963–6976.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I., 1988. Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.* 263, 15245–15248.
- Kessler, R., Eschrich, K., 2001. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 87, 190–195.
- Kety, S.S., 1972. The possible role of the adrenergic systems of the cortex in learning. *Res. Publ. - Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 50, 376–389.
- Kikuchi, S., Shinpo, K., Moriwaka, F., Makita, Z., Miyata, T., Tashiro, K., 1999. Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-deoxyglucosone on cultured cortical neurons: synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Res.* 57, 280–289. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990715)57:2<280::AID-JNR14>3.0.CO;2-U
- Kilduff, T.S., Cauli, B., Gerashchenko, D., 2011. Activation of cortical interneurons during sleep: an anatomical link to homeostatic sleep regulation? *Trends Neurosci.* 34, 10–19. doi : 10.1016/j.tins.2010.09.005
- Kirkwood, A., Rozas, C., Kirkwood, J., Perez, F., Bear, M.F., 1999. Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 1599–1609.
- Kitchigina, V., Vankov, A., Harley, C., Sara, S.J., 1997. Novelty-elicited, noradrenaline-dependent enhancement of excitability in the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 9, 41–47.
- Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D.P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G., Estrada, S., Ausén, B., Debnath, M.L., Barletta, J., Price, J.C., Sandell, J., Lopresti, B.J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C.A., Långström, B., 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* 55, 306–319. doi:10.1002/ana.20009
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., Bossy-Wetzel, E., 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 505–518. doi:10.1038/nrn2417
- Kobayashi, M., Nikami, H., Morimatsu, M., Saito, M., 1996. Expression and localization of insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosci. Lett.* 213, 103–106.
- Kobayashi, M., Sasabe, T., Shiohama, Y., Koshikawa, N., 2008. Activation of alpha1-adrenoceptors increases firing frequency through protein kinase C in pyramidal neurons of rat visual cortex. *Neurosci. Lett.* 430, 175–180. doi : 10.1016/j.neulet.2007.10.047
- Kocharyan, A., Fernandes, P., Tong, X.-K., Vaucher, E., Hamel, E., 2008. Specific subtypes of cortical GABA interneurons contribute to the neurovascular coupling response to basal forebrain stimulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 221–231. doi : 10.1038/sj.jcbfm.9600558
- Koehler-Stec, E.M., Simpson, I.A., Vannucci, S.J., Landschulz, K.T., Landschulz, W.H., 1998. Monocarboxylate transporter expression in mouse brain. *Am. J. Physiol.* 275, E516–524.
- Koizumi, J., 1974. Glycogen in the central nervous system. *Prog. Histochem. Cytochem.* 6, 1–37.
- Kovács, P., Hernádi, I., 2003. Alpha2 antagonist yohimbine suppresses maintained firing of rat prefrontal neurons in vivo. *Neuroreport* 14, 833–836. doi : 10.1097/01.wnr.0000068898.39523.a5
- Krause, M., Offermanns, S., Stocker, M., Pedarzani, P., 2002. Functional specificity of G alpha q and G alpha 11 in the cholinergic and glutamatergic modulation of potassium currents and excitability in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 666–673.
- Krimer, L.S., Goldman-Rakic, P.S., 2001. Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide arbor interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 3788–3796.
- Kulik, A., Haentzsch, A., Lückermann, M., Reichelt, W., Ballanyi, K., 1999. Neuron-glia signaling via alpha (1) adrenoceptor-mediated Ca (2+) release in Bergmann glial cells in situ. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 8401–8408.
- Kvetnansky, R., Sabban, E.L., Palkovits, M., 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol. Rev.* 89, 535–606. doi:10.1152/physrev.00042.2006
- Kwo-On-Yuen, P.F., Newmark, R.D., Budinger, T.F., Kaye, J.A., Ball, M.J., Jagust, W.J., 1994. Brain N-acetyl-L-aspartic acid in Alzheimer's disease: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Brain Res.* 667, 167–174.

- Laing, M., Bashir, Z.I., 2014. β -Adrenoceptors and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Neuroscience* 273, 163–173. doi : 10.1016/j.neuroscience.2014.04.070
- Lambert, J.C., et al., 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458. doi : 10.1038/ng.2802
- Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crépel, F., Rossier, J., 1992. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9, 247–258.
- Lancaster, B., Batchelor, A.M., 2000. Novel action of BAPTA series chelators on intrinsic K⁺ currents in rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 522 Pt 2, 231–246.
- Landau, S.M., Harvey, D., Madison, C.M., Reiman, E.M., Foster, N.L., Aisen, P.S., Petersen, R.C., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Jack, C.R., Weiner, M.W., Jagust, W.J., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Comparing predictors of conversion and decline in mild cognitive impairment. *Neurology* 75, 230–238. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e8e8b8
- Lane, R.F., Shineman, D.W., Steele, J.W., Lee, L.B.H., Fillit, H.M., 2012. Beyond amyloid: the future of therapeutics for Alzheimer's disease. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 64, 213–271. doi:10.1016/B978-0-12-394816-8.00007-6
- Law-Tho, D., Crepel, F., Hirsch, J.C., 1993. Noradrenaline decreases transmission of NMDA- and non-NMDA-receptor mediated monosynaptic EPSPs in rat prefrontal neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1494–1500.
- Lebon, V., Petersen, K.F., Cline, G.W., Shen, J., Mason, G.F., Dufour, S., Behar, K.L., Shulman, G.I., Rothman, D.L., 2002. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1523–1531.
- Lecas, J.-C., 2004. Locus coeruleus activation shortens synaptic drive while decreasing spike latency and jitter in sensorimotor cortex. Implications for neuronal integration. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2519–2530. doi : 10.1111/j.0953-816X.2004.03341.x
- Lecrux, C., Toussay, X., Kocharyan, A., Fernandes, P., Neupane, S., Lévesque, M., Plaisier, F., Shmuel, A., Cauli, B., Hamel, E., 2011. Pyramidal neurons are “neurogenic hubs” in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9836–9847. doi:10.1523/JNEUROSCI.4943-10.2011
- Lee, A., Rosin, D.L., Van Bockstaele, E.J., 1998. Ultrastructural evidence for prominent postsynaptic localization of α 2C-adrenergic receptors in catecholaminergic dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. *J. Comp. Neurol.* 394, 218–229.
- Lee, C.C., Winer, J.A., 2008a. Connections of cat auditory cortex: III. Corticocortical system. *J. Comp. Neurol.* 507, 1920–1943. doi:10.1002/cne.21613
- Lee, C.C., Winer, J.A., 2008b. Connections of cat auditory cortex: II. Commissural system. *J. Comp. Neurol.* 507, 1901–1919. doi:10.1002/cne.21614
- Lee, J.-E., Jeon, C.-J., 2005. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-containing neurons in mouse and rabbit visual cortex and co-localization with calcium-binding proteins. *Mol. Cells* 19, 408–417.
- Lee, W.H., Bondy, C.A., 1993. Ischemic injury induces brain glucose transporter gene expression. *Endocrinology* 133, 2540–2544. doi:10.1210/endo.133.6.8243275
- Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P.J., Rothstein, J.D., 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443–448. doi:10.1038/nature11314
- Leino, R.L., Gerhart, D.Z., van Bueren, A.M., McCall, A.L., Drewes, L.R., 1997. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 49, 617–626. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19970901)49:5<617: AID-JNR12>3.0.CO;2-S
- Leloup, C., Arluison, M., Kassis, N., Lepetit, N., Cartier, N., Ferré, P., Pénicaud, L., 1996. Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38, 45–53.
- Lennie, P., 2003. The cost of cortical computation. *Curr. Biol. CB* 13, 493–497.
- Lent, R., Azevedo, F.A.C., Andrade-Moraes, C.H., Pinto, A.V.O., 2012. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1–9. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07923.x
- Lestienne, R., 2001. Spike timing, synchronization and information processing on the sensory side of the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 65, 545–591.
- Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 9620–9628.

- Lewis, L.D., Ljunggren, B., Norberg, K., Siesjö, B.K., 1974. Changes in carbohydrate substrates, amino acids and ammonia in the brain during insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 23, 659–671.
- Li, B.M., Mao, Z.M., Wang, M., Mei, Z.T., 1999. Alpha-2 adrenergic modulation of prefrontal cortical neuronal activity related to spatial working memory in monkeys. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 21, 601–610. doi:10.1016/S0893-133X(99)00070-6
- Li, Y., Rinne, J.O., Mosconi, L., Pirraglia, E., Rusinek, H., DeSanti, S., Kemppainen, N., Någren, K., Kim, B.-C., Tsui, W., de Leon, M.J., 2008. Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 2169–2181. doi:10.1007/s00259-008-0833-y
- Liang, W.S., Reiman, E.M., Valla, J., Dunckley, T., Beach, T.G., Grover, A., Niedzielko, T.L., Schneider, L.E., Mastroeni, D., Caselli, R., Kukull, W., Morris, J.C., Hulette, C.M., Schmechel, D., Rogers, J., Stephan, D.A., 2008. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4441–4446. doi:10.1073/pnas.0709259105
- Liemburg-Apers, D.C., Schirris, T.J.J., Russel, F.G.M., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H., 2015. Mitochondrial Dysfunction Triggers a Rapid Compensatory Increase in Steady-State Glucose Flux. *Biophys. J.* 109, 1372–1386. doi : 10.1016/j.bpj.2015.08.002
- Lin, A.-L., Rothman, D.L., 2014. What have novel imaging techniques revealed about metabolism in the aging brain? *Future Neurol.* 9, 341–354. doi:10.2217/fnl.14.13
- Linden, J.F., Schreiner, C.E., 2003. Columnar transformations in auditory cortex? A comparison to visual and somatosensory cortices. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 13, 83–89.
- Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X., 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 132, 1820–1832. doi:10.1093/brain/awp099
- Liu, W., Yuen, E.Y., Allen, P.B., Feng, J., Greengard, P., Yan, Z., 2006. Adrenergic modulation of NMDA receptors in prefrontal cortex is differentially regulated by RGS proteins and spinophilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18338–18343. doi:10.1073/pnas.0604560103
- Llinás, R.R., 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242, 1654–1664.
- Lloret, A., Badía, M.-C., Mora, N.J., Ortega, A., Pallardó, F.V., Alonso, M.-D., Atamna, H., Viña, J., 2008. Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 2019–2025. doi : 10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.017
- Lo, C.-Y., Wang, P.-N., Chou, K.-H., Wang, J., He, Y., Lin, C.-P., 2010. Diffusion tensor tractography reveals abnormal topological organization in structural cortical networks in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 16876–16885. doi : 10.1523/JNEUROSCI.4136-10.2010
- Locasale, J.W., Cantley, L.C., 2011. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.* 14, 443–451. doi : 10.1016/j.cmet.2011.07.014
- Lorton, D., Davis, J.N., 1987. The distribution of beta-1- and beta-2-adrenergic receptors of normal and reeler mouse brain: an in vitro autoradiographic study. *Neuroscience* 23, 199–210.
- Loughlin, S.E., Foote, S.L., Grzanna, R., 1986. Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18, 307–319.
- Lovestone, S., Reynolds, C.H., Latimer, D., Davis, D.R., Anderton, B.H., Gallo, J.M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S., 1994. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr. Biol. CB* 4, 1077–1086.
- Lublin, A.L., Gandy, S., 2010. Amyloid-beta oligomers: possible roles as key neurotoxins in Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 77, 43–49. doi:10.1002/msj.20160
- Lucas, J.J., Hernández, F., Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., Hen, R., Avila, J., 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39. doi:10.1093/emboj/20.1.27
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., Trinchese, F., Liu, S., Gunn-Moore, F., Lue, L.-F., Walker, D.G., Kuppusamy, P., Zewier, Z.L., Arancio, O., Stern, D., Yan, S.S., Wu, H., 2004. AβAD directly links Aβeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448–452. doi:10.1126/science.1091230
- Lüth, H.-J., Ogunlade, V., Kuhla, B., Kientsch-Engel, R., Stahl, P., Webster, J., Arendt, T., Münch, G., 2005. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 15, 211–220. doi:10.1093/cercor/bhh123

- Ma, J.-F., Huang, Y., Chen, S.-D., Halliday, G., 2010. Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 36, 312–319. doi : 10.1111/j.1365-2990.2010.01067.x
- Macfarlane, M.G., Weil-Malherbe, H., 1941. Changes in phosphate distribution during anaerobic glycolysis in brain slices. *Biochem. J.* 35, 1–6.
- Madison, D.V., Nicoll, R.A., 1988. Norepinephrine decreases synaptic inhibition in the rat hippocampus. *Brain Res.* 442, 131–138.
- Madison, D.V., Nicoll, R.A., 1986a. Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones, *in vitro*. *J. Physiol.* 372, 221–244.
- Madison, D.V., Nicoll, R.A., 1986b. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate mediates beta-receptor actions of noradrenaline in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 372, 245–259.
- Madison, D.V., Nicoll, R.A., 1984. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones *in vitro*. *J. Physiol.* 354, 319–331.
- Madison, D.V., Nicoll, R.A., 1982. Noradrenaline blocks accommodation of pyramidal cell discharge in the hippocampus. *Nature* 299, 636–638.
- Magistretti, P.J., 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J. Exp. Biol.* 209, 2304–2311. doi:10.1242/jeb.02208
- Magistretti, P.J., Morrison, J.H., Shoemaker, W.J., Sapin, V., Bloom, F.E., 1981. Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 6535–6539.
- Magistretti, P.J., Sorg, O., Yu, N., Martin, J.L., Pellerin, L., 1993. Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev. Neurosci.* 15, 306–312.
- Maher, F., Davies-Hill, T.M., Lysko, P.G., Henneberry, R.C., Simpson, I.A., 1991. Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 351–360.
- Maher, F., Davies-Hill, T.M., Simpson, I.A., 1996. Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochem. J.* 315, 827–831. doi:10.1042/bj3150827
- Maher, F., Simpson, I.A., 1994. The GLUT3 glucose transporter is the predominant isoform in primary cultured neurons: assessment by biosynthetic and photoaffinity labelling. *Biochem. J.* 301 (Pt 2), 379–384.
- Maher, F., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8, 1003–1011.
- Mair, R.D., Zhang, Y., Bailey, K.R., Toupin, M.M., Mair, R.G., 2005. Effects of clonidine in the locus coeruleus on prefrontal- and hippocampal-dependent measures of attention and memory in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 181, 280–288. doi:10.1007/s00213-005-2263-x
- Maity, S., Rah, S., Sonenberg, N., Gkogkas, C.G., Nguyen, P.V., 2015. Norepinephrine triggers metaplasticity of LTP by increasing translation of specific mRNAs. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 22, 499–508. doi:10.1101/lm.039222.115
- Makar, T.K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A.S., Perumal, A.S., Cooper, A.J., 1994. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* 62, 45–53.
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H., 2006. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437–1449. doi:10.1093/hmg/ddl066
- Manes, N.P., El-Maghrabi, M.R., 2005. The kinase activity of human brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase is regulated via inhibition by phosphoenolpyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 438, 125–136. doi : 10.1016/j.abb.2005.04.011
- Manolescu, A.R., Augustin, R., Moley, K., Cheeseman, C., 2007. A highly conserved hydrophobic motif in the exofacial vestibule of fructose transporting SLC2A proteins acts as a critical determinant of their substrate selectivity. *Mol. Membr. Biol.* 24, 455–463. doi:10.1080/09687680701298143
- Mantych, G.J., James, D.E., Chung, H.D., Devaskar, S.U., 1992. Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology* 131, 1270–1278. doi:10.1210/endo.131.3.1505464
- Manunta, Y., Edeline, J.-M., 2004. Noradrenergic induction of selective plasticity in the frequency tuning of auditory cortex neurons. *J. Neurophysiol.* 92, 1445–1463. doi:10.1152/jn.00079.2004

- Mapstone, M., Cheema, A.K., Fiandaca, M.S., Zhong, X., Mhyre, T.R., MacArthur, L.H., Hall, W.J., Fisher, S.G., Peterson, D.R., Haley, J.M., Nazar, M.D., Rich, S.A., Berlau, D.J., Peltz, C.B., Tan, M.T., Kawas, C.H., Federoff, H.J., 2014. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* 20, 415–418. doi:10.1038/nm.3466
- Marcus, D.L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J.S., Strafaci, J.A., Freedman, M.L., 1998. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 150, 40–44. doi:10.1006/exnr.1997.6750
- Marek, G.J., Aghajanian, G.K., 1999. 5-HT_{2A} receptor or alpha₁-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 367, 197–206.
- Marsh, M., McMahon, H.T., 1999. The structural era of endocytosis. *Science* 285, 215–220.
- Martín, E.D., Araque, A., Buño, W., 2001. Synaptic regulation of the slow Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J. Neurophysiol.* 86, 2878–2886.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K., Norenberg, M., 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195, 1356–1358. doi:10.1126/science.14400
- Maruyama, M., Shimada, H., Suhara, T., Shinotoh, H., Ji, B., Maeda, J., Zhang, M.-R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Ono, M., Masamoto, K., Takano, H., Sahara, N., Iwata, N., Okamura, N., Furumoto, S., Kudo, Y., Chang, Q., Saido, T.C., Takashima, A., Lewis, J., Jang, M.-K., Aoki, I., Ito, H., Higuchi, M., 2013. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 79, 1094–1108. doi : 10.1016/j.neuron.2013.07.037
- Mason, G.F., Gruetter, R., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G., Novotny, E.J., 1995. Simultaneous determination of the rates of the TCA cycle, glucose utilization, alpha-ketoglutarate/glutamate exchange, and glutamine synthesis in human brain by NMR. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 12–25. doi:10.1038/jcbfm.1995.2
- Mastrogiacoma, F., Lindsay, J.G., Bettendorff, L., Rice, J., Kish, S.J., 1996. Brain protein and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 39, 592–598. doi:10.1002/ana.410390508
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P., 2010. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58, 1094–1103. doi:10.1002/glia.20990
- Mattson, M.P., 2002. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurovirol.* 8, 539–550. doi:10.1080/13550280290100978
- McCall, A.L., Van Bueren, A.M., Nipper, V., Moholt-Siebert, M., Downes, H., Lessov, N., 1996. Forebrain ischemia increases GLUT1 protein in brain microvessels and parenchyma. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 69–76. doi:10.1097/00004647-199601000-00008
- McCaslin, A.F.H., Chen, B.R., Radosevich, A.J., Cauli, B., Hillman, E.M.C., 2011. In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 795–806. doi:10.1038/jcbfm.2010.204
- McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W., Prince, D.A., 1985. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* 54, 782–806.
- McCormick, D.A., Pape, H.C., 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol.* 431, 291–318.
- McCormick, D.A., Pape, H.C., Williamson, A., 1991. Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system. *Prog. Brain Res.* 88, 293–305.
- McCormick, D.A., Williamson, A., 1989. Convergence and divergence of neurotransmitter action in human cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8098–8102.
- McCune, S.K., Voigt, M.M., Hill, J.M., 1993. Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience* 57, 143–151.
- McEwen, B.S., Reagan, L.P., 2004. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 13–24. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.02.041
- McGaugh, J.L., Roozendaal, B., 2009. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology (Berl.)* 202, 3–14. doi : 10.1007/s00213-008-1285-6
- McILWAIN, H., 1953. Substances which support respiration and metabolic response to electrical impulses in human cerebral tissues. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 16, 257–266.

- McKenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J., Zielke, H.R., 1996. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.* 66, 386–393.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, C.H., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 263–269. doi : 10.1016/j.jalz.2011.03.005
- Medina, M., 2011. Recent developments in tau-based therapeutics for neurodegenerative diseases. *Recent Patents CNS Drug Discov.* 6, 20–30.
- Melyan, Z., Wheal, H.V., Lancaster, B., 2002. Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron* 34, 107–114.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., Meisel, A., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597. doi : 10.1016/j.tins.2013.07.001
- Milligan, G., 2007. G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 825–835. doi : 10.1016/j.bbamem.2006.09.021
- Milner, T.A., Lee, A., Aicher, S.A., Rosin, D.L., 1998. Hippocampal alpha2a-adrenergic receptors are located predominantly presynaptically but are also found postsynaptically and in selective astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 395, 310–327.
- Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K.A., Foster, N.L., Kuhl, D.E., 1997. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 42, 85–94. doi:10.1002/ana.410420114
- Mintun, M.A., Larossa, G.N., Sheline, Y.I., Dence, C.S., Lee, S.Y., Mach, R.H., Klunk, W.E., Mathis, C.A., DeKosky, S.T., Morris, J.C., 2006. [11C] PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 67, 446–452. doi : 10.1212/01.wnl.0000228230.26044.a4
- Mooradian, A.D., Chung, H.C., Shah, G.N., 1997. GLUT-1 expression in the cerebra of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 18, 469–474.
- Morairty, S.R., Dittrich, L., Pasumarthi, R.K., Valladao, D., Heiss, J.E., Gerashchenko, D., Kilduff, T.S., 2013. A role for cortical nNOS/NK1 neurons in coupling homeostatic sleep drive to EEG slow wave activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20272–20277. doi:10.1073/pnas.1314762110
- Morilak, D.A., Frazer, A., 2004. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7, 193–218. doi:10.1017/S1461145704004080
- Mosconi, L., 2005. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32, 486–510. doi:10.1007/s00259-005-1762-7
- Mosconi, L., De Santi, S., Li, Y., Li, J., Zhan, J., Tsui, W.H., Boppana, M., Pupi, A., de Leon, M.J., 2006. Visual rating of medial temporal lobe metabolism in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using FDG-PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33, 210–221. doi:10.1007/s00259-005-1956-z
- Mosconi, L., De Santi, S., Rusinek, H., Convit, A., de Leon, M.J., 2004. Magnetic resonance and PET studies in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* 4, 831–849. doi:10.1586/14737175.4.5.831
- Mosconi, L., Mistur, R., Switalski, R., Brys, M., Glodzik, L., Rich, K., Pirraglia, E., Tsui, W., De Santi, S., de Leon, M.J., 2009. Declining brain glucose metabolism in normal individuals with a maternal history of Alzheimer disease. *Neurology* 72, 513–520. doi : 10.1212/01.wnl.0000333247.51383.43
- Mosconi, L., Pupi, A., De Leon, M.J., 2008. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 180–195. doi : 10.1196/annals.1427.007
- Mosconi, L., Tsui, W.-H., De Santi, S., Li, J., Rusinek, H., Convit, A., Li, Y., Boppana, M., de Leon, M.J., 2005. Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis. *Neurology* 64, 1860–1867. doi : 10.1212/01.WNL.0000163856.13524.08
- Motori, E., Puyal, J., Toni, N., Ghanem, A., Angeloni, C., Malaguti, M., Cantelli-Forti, G., Berninger, B., Conzelmann, K.-K., Götz, M., Winklhofer, K.F., Hrelia, S., Bergami, M., 2013. Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance. *Cell Metab.* 18, 844–859. doi : 10.1016/j.cmet.2013.11.005

- Mountcastle, V.B., 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain J. Neurol.* 120 (Pt 4), 701–722.
- Mountcastle, V.B., 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.* 20, 408–434.
- Mouradian, R.D., Sessler, F.M., Waterhouse, B.D., 1991. Noradrenergic potentiation of excitatory transmitter action in cerebrocortical slices: evidence for mediation by an alpha 1 receptor-linked second messenger pathway. *Brain Res.* 546, 83–95.
- Mouton, P.R., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J., Price, D.L., 1994. Absolute number and size of pigmented locus coeruleus neurons in young and aged individuals. *J. Chem. Neuroanat.* 7, 185–190.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F., 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941–945.
- Mulligan, S.J., MacVicar, B.A., 2004. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431, 195–199. doi:10.1038/nature02827
- Mulukutla, B.C., Khan, S., Lange, A., Hu, W.-S., 2010. Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol.* 28, 476–484. doi : 10.1016/j.tibtech.2010.06.005
- Mulukutla, B.C., Yongky, A., Daoutidis, P., Hu, W.-S., 2014. Bistability in glycolysis pathway as a physiological switch in energy metabolism. *PLoS One* 9, e98756. doi : 10.1371/journal.pone.0098756
- Münch, G., Deuther-Conrad, W., Gasic-Milenkovic, J., 2002. Glycooxidative stress creates a vicious cycle of neurodegeneration in Alzheimer's disease--a target for neuroprotective treatment strategies? *J. Neural Transm. Suppl.* 303–307.
- Münch, G., Thome, J., Foley, P., Schinzel, R., Riederer, P., 1997. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 23, 134–143.
- Münch, G., Westcott, B., Menini, T., Gugliucci, A., 2012. Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids* 42, 1221–1236. doi:10.1007/s00726-010-0777-y
- Murchison, C.F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A., Thomas, S.A., 2004. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117, 131–143.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13. doi:10.1042/BJ20081386
- Murphy, S., Simmons, M.L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E., Reis, D.J., Minc-Golomb, D., Schwartz, J.P., 1993. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* 16, 323–328.
- Myöhänen, T.T., Schendzielorz, N., Männistö, P.T., 2010. Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J. Neurochem.* 113, 1632–1643. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06723.x
- Nagamatsu, S., Kornhauser, J.M., Burant, C.F., Seino, S., Mayo, K.E., Bell, G.I., 1992. Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J. Biol. Chem.* 267, 467–472.
- Nassar, M., Simonnet, J., Lofredi, R., Cohen, I., Savary, E., Yanagawa, Y., Miles, R., Fricker, D., 2015. Diversity and overlap of parvalbumin and somatostatin expressing interneurons in mouse presubiculum. *Front. Neural Circuits* 9, 20. doi : 10.3389/fncir.2015.00020
- Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A., 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* 40, 163–221.
- Nehlig, A., Wittendorp-Rechenmann, E., Lam, C.D., 2004. Selective uptake of [¹⁴C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular ¹⁴C-trajectory combined with immunohistochemistry. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1004–1014. doi : 10.1097/01.WCB.0000128533.84196.D8
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Haroutunian, V., Hof, P.R., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Iwatsubo, T., Jellinger, K.A., Jicha, G.A., Kövari, E., Kukull, W.A., Leverenz, J.B., Love, S., Mackenzie, I.R., Mann, D.M., Masliah, E., McKee, A.C., Montine, T.J., Morris, J.C., Schneider, J.A., Sonnen, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Wisniewski, T., Woltjer, R.L., Beach, T.G., 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381. doi:10.1097/NEN.0b013e31825018f7
- Neuman, R.S., Harley, C.W., 1983. Long-lasting potentiation of the dentate gyrus population spike by norepinephrine. *Brain Res.* 273, 162–165.
- Nicholas, A.P., Hökfelt, T., Pieribone, V.A., 1996. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 245–255.

- Nicholas, A.P., Pieribone, V., Hökfelt, T., 1993a. Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 328, 575–594. doi:10.1002/cne.903280409
- Nicholas, A.P., Pieribone, V.A., Hökfelt, T., 1993b. Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 56, 1023–1039.
- Nicholls, D., Attwell, D., 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 462–468.
- Nicholson, C., Syková, E., 1998. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 21, 207–215.
- Nicholson, R.M., Kusne, Y., Nowak, L.A., LaFerla, F.M., Reiman, E.M., Valla, J., 2010. Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain Res.* 1347, 179–185. doi : 10.1016/j.brainres.2010.05.084
- Nicoll, R.A., 1988. The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science* 241, 545–551.
- Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Kauer, J.A., 1990. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70, 513–565.
- Nishimura, H., Pallardo, F.V., Seidner, G.A., Vannucci, S., Simpson, I.A., Birnbaum, M.J., 1993. Kinetics of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 8514–8520.
- Niwa, K., Carlson, G.A., Iadecola, C., 2000. Exogenous A beta1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1659–1668. doi:10.1097/00004647-200012000-00005
- Niwa, K., Kazama, K., Younkin, S.G., Carlson, G.A., Iadecola, C., 2002. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiol. Dis.* 9, 61–68. doi : 10.1006/nbdi.2001.0460
- Nomura, S., Bouhadana, M., Morel, C., Faure, P., Cauli, B., Lambollez, B., Hepp, R., 2014. Noradrenalin and dopamine receptors both control cAMP-PKA signaling throughout the cerebral cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 247. doi : 10.3389/fncel.2014.00247
- Nordberg, A., Rinne, J.O., Kadir, A., Långström, B., 2010. The use of PET in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 78–87. doi:10.1038/nrneurol.2009.217
- Nowicky, A.V., Christofi, G., Bindman, L.J., 1992. Investigation of beta-adrenergic modulation of synaptic transmission and postsynaptic induction of associative LTP in layer V neurones in slices of rat sensorimotor cortex. *Neurosci. Lett.* 137, 270–273.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A beta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- O'Donnell, J., Zeppenfeld, D., McConnell, E., Pena, S., Nedergaard, M., 2012. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem. Res.* 37, 2496–2512. doi:10.1007/s11064-012-0818-x
- Ogawa, S., Lee, T.M., Kay, A.R., Tank, D.W., 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9868–9872.
- Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., Bartrons, R., Lange, A.J., 2001. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.* 26, 30–35.
- Okello, A., Koivunen, J., Edison, P., Archer, H.A., Turkheimer, F.E., Någren, K., Bullock, R., Walker, Z., Kennedy, A., Fox, N.C., Rossor, M.N., Rinne, J.O., Brooks, D.J., 2009. Conversion of amyloid positive and negative MCI to AD over 3 years: an 11C-PIB PET study. *Neurology* 73, 754–760. doi : 10.1212/WNL.0b013e3181b23564
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M.-J., Lévesque, M., Slack, R.S., Trudeau, L.-É., 2015. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr. Biol. CB* 25, 2349–2360. doi : 10.1016/j.cub.2015.07.050
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666. doi:10.1038/333664a0
- Pan, J.W., Telang, F.W., Lee, J.H., de Graaf, R.A., Rothman, D.L., Stein, D.T., Hetherington, H.P., 2001. Measurement of beta-hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain. *J. Neurochem.* 79, 539–544.
- Pantel, J., Schröder, J., Essig, M., Jauss, M., Schneider, G., Eysenbach, K., von Kummer, R., Baudendistel, K., Schad, L.R., Knopp, M.V., 1998. In vivo quantification of brain volumes in subcortical vascular dementia and Alzheimer's disease. An MRI-based study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9, 309–316.

- Pappatà, S., Salvatore, E., Postiglione, A., 2008. In vivo imaging of neurotransmission and brain receptors in dementia. *J. Neuroimaging Off. J. Am. Soc. Neuroimaging* 18, 111–124. doi:10.1111/j.1552-6569.2007.00194.x
- Parker, W.D., Parks, J., Filley, C.M., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., 1994. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 44, 1090–1096.
- Parker, W.D., Parks, J.K., 1995. Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization. *Neurology* 45, 482–486.
- Parsons, M.P., Hirasawa, M., 2010. ATP-sensitive potassium channel-mediated lactate effect on orexin neurons: implications for brain energetics during arousal. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8061–8070. doi:10.1523/JNEUROSCI.5741-09.2010
- Paschalis, A., Churchill, L., Marina, N., Kasymov, V., Gourine, A., Ackland, G., 2009. beta1-Adrenoceptor distribution in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 458, 84–88. doi : 10.1016/j.neulet.2009.04.023
- Pasumarthi, R.K., Gerashchenko, D., Kilduff, T.S., 2010. Further characterization of sleep-active neuronal nitric oxide synthase neurons in the mouse brain. *Neuroscience* 169, 149–157. doi : 10.1016/j.neuroscience.2010.04.066
- Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., Tsai, L.H., 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615–622. doi:10.1038/45159
- Paxinos, G., Franklin, K.B., 2004. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Gulf Professional Publishing.
- Payne, J., Maher, F., Simpson, I., Mattice, L., Davies, P., 1997. Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells. *Glia* 21, 327–331.
- Pearson-Leary, J., McNay, E.C., 2016. Novel Roles for the Insulin-Regulated Glucose Transporter-4 in Hippocampally Dependent Memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 11851–11864. doi:10.1523/JNEUROSCI.1700-16.2016
- Pedarzani, P., Storm, J.F., 1996. Interaction between alpha- and beta-adrenergic receptor agonists modulating the slow Ca (2+)-activated K⁺ current IAHP in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2098–2110.
- Pedarzani, P., Storm, J.F., 1993. PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K⁺ current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron* 11, 1023–1035.
- Pedersen, P.L., Carafoli, E., 1987. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12, 146–150. doi:10.1016/0968-0004(87)90071-5
- Pellerin, L., 2005. How astrocytes feed hungry neurons. *Mol. Neurobiol.* 32, 59–72. doi : 10.1385/MN :32 :1 :059
- Pellerin, L., 2003. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem. Int.* 43, 331–338.
- Pellerin, L., Bonvento, G., Chatton, J.Y., Pierre, K., Magistretti, P.J., 2002. Role of neuron-glia interaction in the regulation of brain glucose utilization. *Diabetes Nutr. Metab.* 15, 268–273; discussion 273.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–10629.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., Attwell, D., 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443, 700–704. doi:10.1038/nature05193
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431. doi : 10.1016/j.tins.2009.05.001
- Perrenoud, Q., Rossier, J., Geoffroy, H., Vitalis, T., Gallopin, T., 2013. Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 23, 423–441. doi : 10.1093/cercor/bhs032
- Perugini, A., Laing, M., Berretta, N., Aicardi, G., Bashir, Z.I., 2012. Synaptic plasticity from amygdala to perirhinal cortex: a possible mechanism for emotional enhancement of visual recognition memory? *Eur. J. Neurosci.* 36, 2421–2427. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08146.x
- Peters, A., Harriman, K.M., 1988. Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 267, 409–432. doi:10.1002/cne.902670310
- Petersen, R.C., Doody, R., Kurz, A., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rabins, P.V., Ritchie, K., Rosser, M., Thal, L., Winblad, B., 2001. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 58, 1985–1992.
- Petilla Interneuron Nomenclature Group, Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T.F., Gardner, D., Gardner, E.P., Goldberg, J.H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvárdy, Z.F., Lambolez, B., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., Muñoz, A., Packer, A., Petersen, C.C.H., Rockland, K.S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger,

- J.F., Tamas, G., Thomson, A.M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D.C., Yuste, R., 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557–568. doi:10.1038/nrn2402
- Pfeiffer-Guglielmi, B., Fleckenstein, B., Jung, G., Hamprecht, B., 2003. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J. Neurochem.* 85, 73–81.
- Phelps, C.H., 1972. Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res.* 39, 225–234.
- Phelps, M.E., 2000. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9226–9233.
- Phelps, M.E., Huang, S.C., Hoffman, E.J., Selin, C., Sokoloff, L., Kuhl, D.E., 1979. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann. Neurol.* 6, 371–388. doi:10.1002/ana.410060502
- Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M.-Y., Klein, P.S., 2003. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423, 435–439. doi:10.1038/nature01640
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P.A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., Wyss-Coray, T., 2008. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2190–2199. doi:10.1172/JCI33585
- Pieribone, V.A., Nicholas, A.P., Dagerlind, A., Hökfelt, T., 1994. Distribution of alpha 1 adrenoceptors in rat brain revealed by in situ hybridization experiments utilizing subtype-specific probes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 4252–4268.
- Pierre, K., Chatton, J.-Y., Parent, A., Repond, C., Gardoni, F., Di Luca, M., Pellerin, L., 2009. Linking supply to demand: the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 and the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor GluR2/3 subunit are associated in a common trafficking process. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1951–1963. doi : 10.1111/j.1460-9568.2009.06756.x
- Poitry-Yamate, C.L., Poitry, S., Tsacopoulos, M., 1995. Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 5179–5191.
- Porras, O.H., Loaiza, A., Barros, L.F., 2004. Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9669–9673. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1882-04.2004
- Porras, O.H., Ruminot, I., Loaiza, A., Barros, L.F., 2008. Na (+)-Ca (2+) cosignaling in the stimulation of the glucose transporter GLUT1 in cultured astrocytes. *Glia* 56, 59–68. doi : 10.1002/glia.20589
- Porter, J.T., Cauli, B., Staiger, J.F., Lambolez, B., Rossier, J., Audinat, E., 1998. Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3617–3628.
- Povova, J., Ambroz, P., Bar, M., Pavukova, V., Sery, O., Tomaskova, H., Janout, V., 2012. Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* 156, 108–114. doi:10.5507/bp.2012.055
- Praticò, D., MY Lee, V., Trojanowski, J.Q., Rokach, J., Fitzgerald, G.A., 1998. Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 1777–1783.
- Pribram, K.H., McGuinness, D., 1975. Arousal, activation, and effort in the control of attention. *Psychol. Rev.* 82, 116–149.
- Pritchard, S.M., Dolan, P.J., Vitkus, A., Johnson, G.V.W., 2011. The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1621–1635. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01273.x
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344. doi:10.1056/NEJMra0909142
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481–487.
- Raichle, M.E., Hartman, B.K., Eichling, J.O., Sharpe, L.G., 1975. Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3726–3730.
- Rainbow, T.C., Parsons, B., Wolfe, B.B., 1984. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1585–1589.
- Ralser, M., Wameling, M.M., Struys, E.A., Joppich, C., Krobisch, S., Jakobs, C., Lehrach, H., 2008. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 17807–17811. doi:10.1073/pnas.0803090105

- Ramasamy, R., Vannucci, S.J., Yan, S.S.D., Herold, K., Yan, S.F., Schmidt, A.M., 2005. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* 15, 16R–28R. doi:10.1093/glycob/cwi053
- Ramírez, B.G., Rodrigues, T.B., Violante, I.R., Cruz, F., Fonseca, L.L., Ballesteros, P., Castro, M.M.C.A., García-Martín, M.L., Cerdán, S., 2007. Kinetic properties of the redox switch/redox coupling mechanism as determined in primary cultures of cortical neurons and astrocytes from rat brain. *J. Neurosci. Res.* 85, 3244–3253. doi:10.1002/jnr.21386
- Ramos, B.P., Arnsten, A.F.T., 2007. Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol. Ther.* 113, 523–536. doi : 10.1016/j.pharmthera.2006.11.006
- Ramos, B.P., Colgan, L.A., Nou, E., Arnsten, A.F.T., 2008. Beta2 adrenergic agonist, clenbuterol, enhances working memory performance in aging animals. *Neurobiol. Aging* 29, 1060–1069. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.003
- Rao, V.S., Cupples, A., van Duijn, C.M., Kurz, A., Green, R.C., Chui, H., Duara, R., Auerbach, S.A., Volicer, L., Wells, J., van Broeckhoven, C., Growdon, J.H., Haines, J.L., Farrer, L.A., 1996. Evidence for major gene inheritance of Alzheimer disease in families of patients with and without apolipoprotein E epsilon 4. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 664–675.
- Rayner, D.V., Thomas, M.E., Trayhurn, P., 1994. Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72, 476–479.
- Rebois, R.V., Hébert, T.E., 2003. Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors Channels* 9, 169–194.
- Reddy, P.H., Beal, M.F., 2008. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 14, 45–53. doi : 10.1016/j.molmed.2007.12.002
- Reichmann, H., Flörke, S., Hebenstreit, G., Schrubar, H., Riederer, P., 1993. Analyses of energy metabolism and mitochondrial genome in post-mortem brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 240, 377–380.
- Reiman, E.M., Caselli, R.J., Yun, L.S., Chen, K., Bandy, D., Minoshima, S., Thibodeau, S.N., Osborne, D., 1996. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N. Engl. J. Med.* 334, 752–758. doi:10.1056/NEJM199603213341202
- Reiman, E.M., Quiroz, Y.T., Fleisher, A.S., Chen, K., Velez-Pardo, C., Jimenez-Del-Rio, M., Fagan, A.M., Shah, A.R., Alvarez, S., Arbelaez, A., Giraldo, M., Acosta-Baena, N., Sperling, R.A., Dickerson, B., Stern, C.E., Tirado, V., Munoz, C., Reiman, R.A., Huentelman, M.J., Alexander, G.E., Langbaum, J.B.S., Kosik, K.S., Tariot, P.N., Lopera, F., 2012. Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol.* 11, 1048–1056. doi:10.1016/S1474-4422(12)70228-4
- Reivich, M., Kuhl, D., Wolf, A., Greenberg, J., Phelps, M., Ido, T., Casella, V., Fowler, J., Hoffman, E., Alavi, A., Som, P., Sokoloff, L., 1979. The [18F] fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. *Circ. Res.* 44, 127–137.
- Richard, J.P., 1993. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 549–553.
- Ringman, J.M., Medina, L.D., Rodriguez-Agudelo, Y., Chavez, M., Lu, P., Cummings, J.L., 2009. Current concepts of mild cognitive impairment and their applicability to persons at-risk for familial Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 6, 341–346.
- Rinne, J.O., Laine, M., Hiltunen, J., Erkinjuntti, T., 2003. Semantic decision making in early probable AD: a PET activation study. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 18, 89–96.
- Robbins, T.W., 1997. Arousal systems and attentional processes. *Biol. Psychol.* 45, 57–71.
- Rodriguez, M., Carillon, C., Coquerel, A., Le Fur, G., Ferrara, P., Caput, D., Shire, D., 1995. Evidence for the presence of beta 3-adrenergic receptor mRNA in the human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 29, 369–375.
- Rodriguez-Rodriguez, P., Fernandez, E., Almeida, A., Bolaños, J.P., 2012. Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 19, 1582–1589. doi:10.1038/cdd.2012.33
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., 1996. Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron* 16, 675–686. doi:10.1016/S0896-6273(00)80086-0
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13, 713–725.

- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., Giaume, C., 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322, 1551–1555. doi:10.1126/science.1164022
- Ruano, D., Lambolez, B., Rossier, J., Paternain, A.V., Lerma, J., 1995. Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron* 14, 1009–1017.
- Russell, R.L., Siedlak, S.L., Raina, A.K., Bautista, J.M., Smith, M.A., Perry, G., 1999. Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 370, 236–239. doi:10.1006/abbi.1999.1404
- Sadikot, A.F., Parent, A., 1990. The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel monkey: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 36, 431–447.
- Sagara, J.I., Miura, K., Bannai, S., 1993. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J. Neurochem.* 61, 1672–1676.
- Salgado, H., Köhr, G., Treviño, M., 2012. Noradrenergic “tone” determines dichotomous control of cortical spike-timing-dependent plasticity. *Sci. Rep.* 2, 417. doi:10.1038/srep00417
- Salgado, H., Treviño, M., Atzori, M., 2016. Layer- and area-specific actions of norepinephrine on cortical synaptic transmission. *Brain Res.* 1641, 163–176. doi : 10.1016/j.brainres.2016.01.033
- Salomone, S., Caraci, F., Leggio, G.M., Fedotova, J., Drago, F., 2012. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer’s disease: focus on disease modifying drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73, 504–517. doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04134.x
- Samson, Y., Wu, J.J., Friedman, A.H., Davis, J.N., 1990. Catecholaminergic innervation of the hippocampus in the cynomolgus monkey. *J. Comp. Neurol.* 298, 250–263. doi : 10.1002/cne.902980209
- Sancheti, H., Patil, I., Kanamori, K., Díaz Brinton, R., Zhang, W., Lin, A.-L., Cadenas, E., 2014. Hypermetabolic state in the 7-month-old triple transgenic mouse model of Alzheimer’s disease and the effect of lipoic acid: a ¹³C-NMR study. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1749–1760. doi:10.1038/jcbfm.2014.137
- Sandbrink, R., Hartmann, T., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1996. Genes contributing to Alzheimer’s disease. *Mol. Psychiatry* 1, 27–40.
- Sands, S.A., Strong, R., Corbitt, J., Morilak, D.A., 2000. Effects of acute restraint stress on tyrosine hydroxylase mRNA expression in locus coeruleus of Wistar and Wistar-Kyoto rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 75, 1–7.
- Santana, N., Mengod, G., Artigas, F., 2013. Expression of α (1)-adrenergic receptors in rat prefrontal cortex: cellular co-localization with 5-HT(2A) receptors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1139–1151. doi : 10.1017/S1461145712001083
- Sanz, A., Pamplona, R., Barja, G., 2006. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid. Redox Signal.* 8, 582–599. doi:10.1089/ars.2006.8.582
- Sara, S.J., 2009. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 211–223. doi:10.1038/nrn2573
- Sara, S.J., Bouret, S., 2012. Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron* 76, 130–141. doi : 10.1016/j.neuron.2012.09.011
- Sara, S.J., Roullet, P., Przybylski, J., 1999. Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 6, 88–96.
- Sara, S.J., Segal, M., 1991. Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition. *Prog. Brain Res.* 88, 571–585.
- Satake, T., Mitani, H., Nakagome, K., Kaneko, K., 2008. Individual and additive effects of neuromodulators on the slow components of afterhyperpolarization currents in layer V pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 1229, 47–60. doi : 10.1016/j.brainres.2008.06.098
- Sayre, L.M., Zelasko, D.A., Harris, P.L., Perry, G., Salomon, R.G., Smith, M.A., 1997. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* 68, 2092–2097.
- Schaeffer, V., Lavenir, I., Ozcelik, S., Tolnay, M., Winkler, D.T., Goedert, M., 2012. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain J. Neurol.* 135, 2169–2177. doi:10.1093/brain/aws143
- Scheiner-Bobis, G., 2002. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269, 2424–2433.
- Scheinin, N.M., Aalto, S., Koikkalainen, J., Lötjönen, J., Karrasch, M., Kemppainen, N., Viitanen, M., Någren, K., Helin, S., Scheinin, M., Rinne, J.O., 2009. Follow-up of [¹¹C] PIB uptake and brain volume in patients with Alzheimer disease and controls. *Neurology* 73, 1186–1192. doi : 10.1212/WNL.0b013e3181bacf1b

- Schellenberg, G.D., Montine, T.J., 2012. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 305–323. doi:10.1007/s00401-012-0996-2
- Schridde, U., Khubchandani, M., Motelow, J.E., Sanganahalli, B.G., Hyder, F., Blumenfeld, H., 2008. Negative BOLD with large increases in neuronal activity. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 18, 1814–1827. doi:10.1093/cercor/bhm208
- Schroeder, H., Bomont, L., Nehlig, A., 1991. Influence of early chronic phenobarbital treatment on cerebral arteriovenous differences of glucose and ketone bodies in the developing rat. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 9, 453–461.
- Schroeter, S., Apparsundaram, S., Wiley, R.G., Miner, L.H., Sesack, S.R., Blakely, R.D., 2000. Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive l-norepinephrine transporter. *J. Comp. Neurol.* 420, 211–232.
- Schuessel, K., Schäfer, S., Bayer, T.A., Czech, C., Pradier, L., Müller-Spahn, F., Müller, W.E., Eckert, A., 2005. Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 18, 89–99. doi : 10.1016/j.nbd.2004.09.003
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., Geissmann, F., 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90. doi:10.1126/science.1219179
- Schulz, J.B., Matthews, R.T., Beal, M.F., 1995. Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 8, 480–486.
- Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1997. Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res.* 774, 221–224.
- Schwindt, P.C., Spain, W.J., Foehring, R.C., Chubb, M.C., Crill, W.E., 1988a. Slow conductances in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro and their role in slow excitability changes. *J. Neurophysiol.* 59, 450–467.
- Schwindt, P.C., Spain, W.J., Foehring, R.C., Stafstrom, C.E., Chubb, M.C., Crill, W.E., 1988b. Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J. Neurophysiol.* 59, 424–449.
- Segal, M., 1990. Serotonin and local circuits in rat hippocampus. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1, 77–86.
- Segal, M., Bloom, F.E., 1976. The action of norepinephrine in the rat hippocampus. IV. The effects of locus coeruleus stimulation on evoked hippocampal unit activity. *Brain Res.* 107, 513–525.
- Séguéla, P., Watkins, K.C., Geffard, M., Descarries, L., 1990. Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience* 35, 249–264.
- Selkoe, D.J., 1991. Alzheimer's disease. In the beginning. *Nature* 354, 432–433. doi:10.1038/354432a0
- Seo, S.W., Im, K., Lee, J.-M., Kim, S.T., Ahn, H.J., Go, S.M., Kim, S.-H., Na, D.L., 2011. Effects of demographic factors on cortical thickness in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 200–209. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.004
- Seol, G.H., Ziburkus, J., Huang, S., Song, L., Kim, I.T., Takamiya, K., Huganir, R.L., Lee, H.-K., Kirkwood, A., 2007. Neuromodulators control the polarity of spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Neuron* 55, 919–929. doi : 10.1016/j.neuron.2007.08.013
- Serres, S., Raffard, G., Franconi, J.-M., Merle, M., 2008. Close coupling between astrocytic and neuronal metabolisms to fulfill anaplerotic and energy needs in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 712–724. doi : 10.1038/sj.jcbfm.9600568
- Sessler, F.M., Liu, W., Kirifides, M.L., Mouradian, R.D., Lin, R.C., Waterhouse, B.D., 1995. Noradrenergic enhancement of GABA-induced input resistance changes in layer V regular spiking pyramidal neurons of rat somatosensory cortex. *Brain Res.* 675, 171–182.
- Sessler, F.M., Mouradian, R.D., Cheng, J.T., Yeh, H.H., Liu, W.M., Waterhouse, B.D., 1989. Noradrenergic potentiation of cerebellar Purkinje cell responses to GABA: evidence for mediation through the beta-adrenoceptor-coupled cyclic AMP system. *Brain Res.* 499, 27–38.
- Sexton, C.E., Kalu, U.G., Filippini, N., Mackay, C.E., Ebmeier, K.P., 2011. A meta-analysis of diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 2322.e5-18. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.019
- Sheline, Y.I., Morris, J.C., Snyder, A.Z., Price, J.L., Yan, Z., D'Angelo, G., Liu, C., Dixit, S., Benzinger, T., Fagan, A., Goate, A., Mintun, M.A., 2010. APOE4 allele disrupts resting state fMRI connectivity in the absence of amyloid plaques or decreased CSF Aβ42. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 17035–17040. doi:10.1523/JNEUROSCI.3987-10.2010
- Shen, J., Petersen, K.F., Behar, K.L., Brown, P., Nixon, T.W., Mason, G.F., Petroff, O.A., Shulman, G.I., Shulman, R.G., Rothman, D.L., 1999. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8235–8240.

- Sherman, D.L., Brophy, P.J., 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 683–690. doi:10.1038/nrn1743
- Sheu, K.F., Kim, Y.T., Blass, J.P., Weksler, M.E., 1985. An immunochemical study of the pyruvate dehydrogenase deficit in Alzheimer's disease brain. *Ann. Neurol.* 17, 444–449. doi:10.1002/ana.410170505
- Shi, F., Liu, B., Zhou, Y., Yu, C., Jiang, T., 2009. Hippocampal volume and asymmetry in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Meta-analyses of MRI studies. *Hippocampus* 19, 1055–1064. doi:10.1002/hipo.20573
- Shibuki, K., 1989. Calcium-dependent and ouabain-resistant oxygen consumption in the rat neurohypophysis. *Brain Res.* 487, 96–104.
- Shih, J.C., Chen, K., 1999. MAO-A and -B gene knock-out mice exhibit distinctly different behavior. *Neurobiol. Bp. Hung.* 7, 235–246.
- Shinpo, K., Kikuchi, S., Sasaki, H., Ogata, A., Moriwaka, F., Tashiro, K., 2000. Selective vulnerability of spinal motor neurons to reactive dicarbonyl compounds, intermediate products of glycation, in vitro: implication of inefficient glutathione system in spinal motor neurons. *Brain Res.* 861, 151–159.
- Shivamurthy, V.K.N., Tahari, A.K., Marcus, C., Subramaniam, R.M., 2015. Brain FDG PET and the diagnosis of dementia. *AJR Am. J. Roentgenol.* 204, W76-85. doi:10.2214/AJR.13.12363
- Shoffner, J.M., 1997. Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease. *Neurogenetics* 1, 13–19.
- Shulman, G.I., 2004. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiol. Bethesda Md* 19, 183–190. doi:10.1152/physiol.00007.2004
- Shulman, R.G., Rothman, D.L., Behar, K.L., Hyder, F., 2004. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.* 27, 489–495. doi : 10.1016/j.tins.2004.06.005
- Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G., 1998. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 316–321.
- Silver, I.A., Erecińska, M., 1994. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 5068–5076.
- Silverman, D.H., Small, G.W., Chang, C.Y., Lu, C.S., Kung De Aburto, M.A., Chen, W., Czernin, J., Rapoport, S.I., Pietrini, P., Alexander, G.E., Schapiro, M.B., Jagust, W.J., Hoffman, J.M., Welsh-Bohmer, K.A., Alavi, A., Clark, C.M., Salmon, E., de Leon, M.J., Mielke, R., Cummings, J.L., Kowell, A.P., Gambhir, S.S., Hoh, C.K., Phelps, M.E., 2001. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA* 286, 2120–2127.
- Simpson, E., 1992. Positive and negative selection of the T cell repertoire: role of MHC and other ligands. *Int. Rev. Immunol.* 8, 269–277.
- Simpson, I.A., Carruthers, A., Vannucci, S.J., 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1766–1791. doi : 10.1038/sj.jcbfm.9600521
- Simpson, I.A., Chundu, K.R., Davies-Hill, T., Honer, W.G., Davies, P., 1994. Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 35, 546–551. doi:10.1002/ana.410350507
- Simpson, I.A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K.H., Travis, A., Vannucci, S.J., 2008. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E242-253. doi:10.1152/ajpendo.90388.2008
- Simpson, I.A., Vannucci, S.J., DeJoseph, M.R., Hawkins, R.A., 2001. Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 276, 12725–12729. doi:10.1074/jbc.M010897200
- Sims, N.R., Blass, J.P., Murphy, C., Bowen, D.M., Neary, D., 1987. Phosphofructokinase activity in the brain in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 21, 509–510. doi:10.1002/ana.410210517
- Skaper, S.D., 2012. Alzheimer's disease and amyloid: culprit or coincidence? *Int. Rev. Neurobiol.* 102, 277–316. doi:10.1016/B978-0-12-386986-9.00011-9
- Skou, J.C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394–401.
- Sloper, J.J., Hiorns, R.W., Powell, T.P., 1979. A qualitative and quantitative electron microscopic study of the neurons in the primate motor and somatic sensory cortices. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 285, 141–171.
- Small, G.W., La Rue, A., Komo, S., Kaplan, A., Mandelkern, M.A., 1995a. Predictors of cognitive change in middle-aged and older adults with memory loss. *Am. J. Psychiatry* 152, 1757–1764. doi:10.1176/ajp.152.12.1757

- Small, G.W., Mazziotta, J.C., Collins, M.T., Baxter, L.R., Phelps, M.E., Mandelkern, M.A., Kaplan, A., La Rue, A., Adamson, C.F., Chang, L., 1995b. Apolipoprotein E type 4 allele and cerebral glucose metabolism in relatives at risk for familial Alzheimer disease. *JAMA* 273, 942–947.
- Smiley, J.F., McGinnis, J.P., Javitt, D.C., 2000. Nitric oxide synthase interneurons in the monkey cerebral cortex are subsets of the somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin cells. *Brain Res.* 863, 205–212.
- Smirnakis, S.M., Schmid, M.C., Weber, B., Tolias, A.S., Augath, M., Logothetis, N.K., 2007. Spatial specificity of BOLD versus cerebral blood volume fMRI for mapping cortical organization. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1248–1261. doi : 10.1038/sj.jcbfm.9600434
- Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10540–10543.
- Smith, M.A., Richey, P.L., Taneda, S., Kutty, R.K., Sayre, L.M., Monnier, V.M., Perry, G., 1994. Advanced Maillard reaction end products, free radicals, and protein oxidation in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 738, 447–454.
- Smith, P.R., Somani, H.H., Thornalley, P.J., Benn, J., Sonksen, P.H., 1993. Evidence against the formation of 2-amino-6-(2-formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-hexanoic acid ('pyrraline') as an early-stage product or advanced glycation end product in non-enzymic protein glycation. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 84, 87–93.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O., Shinohara, M., 1977. The [¹⁴C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 28, 897–916.
- Sokoloff, L., Takahashi, S., Gotoh, J., Driscoll, B.F., Law, M.J., 1996. Contribution of astroglia to functionally activated energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 18, 344–352.
- Somogyi, P., Klausberger, T., 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562, 9–26. doi:10.1113/jphysiol.2004.078915
- Sperling, R.A., Jack, C.R., Black, S.E., Frosch, M.P., Greenberg, S.M., Hyman, B.T., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, W., Bednar, M.M., Black, R.S., Brashear, H.R., Grundman, M., Siemers, E.R., Feldman, H.H., Schindler, R.J., 2011. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 367–385. doi : 10.1016/j.jalz.2011.05.2351
- Sperling, R.A., Laviolette, P.S., O'Keefe, K., O'Brien, J., Rentz, D.M., Pihlajamaki, M., Marshall, G., Hyman, B.T., Selkoe, D.J., Hedden, T., Buckner, R.L., Becker, J.A., Johnson, K.A., 2009. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron* 63, 178–188. doi : 10.1016/j.neuron.2009.07.003
- Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T., 2014. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82, 756–771. doi : 10.1016/j.neuron.2014.05.004
- Spruston, N., 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 206–221. doi:10.1038/nrn2286
- Stanasila, L., Perez, J.-B., Vogel, H., Cotecchia, S., 2003. Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 278, 40239–40251. doi:10.1074/jbc.M306085200
- Stocker, M., Krause, M., Pedarzani, P., 1999. An apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4662–4667.
- Storm, J.F., 1990. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog. Brain Res.* 83, 161–187.
- Strehler, E.E., 2013. Plasma membrane calcium ATPases as novel candidates for therapeutic agent development. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* 16, 190–206.
- Stuart, G.J., Dodt, H.U., Sakmann, B., 1993. Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch.* 423, 511–518.
- Südhof, T.C., Rizo, J., 2011. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3. doi:10.1101/cshperspect.a005637
- Suh, B.-C., Hille, B., 2005. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 370–378. doi : 10.1016/j.conb.2005.05.005
- Summers, R.J., Papaioannou, M., Harris, S., Evans, B.A., 1995. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 116, 2547–2548.
- Swanson, R.A., 1992. Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70 Suppl, S138-144.

- Swanson, R.A., Choi, D.W., 1993. Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 162–169. doi:10.1038/jcbfm.1993.19
- Tamarappoo, B.K., Raizada, M.K., Kilberg, M.S., 1997. Identification of a system N-like Na (+)-dependent glutamine transport activity in rat brain neurons. *J. Neurochem.* 68, 954–960.
- Tamás, G., Lorincz, A., Simon, A., Szabadics, J., 2003. Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299, 1902–1905. doi : 10.1126/science.1082053
- Tanzi, R.E., Kovacs, D.M., Kim, T.W., Moir, R.D., Guenette, S.Y., Wasco, W., 1996. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 3, 159–168.
- Tavares, A., Handy, D.E., Bogdanova, N.N., Rosene, D.L., Gavras, H., 1996. Localization of alpha 2A- and alpha 2B-adrenergic receptor subtypes in brain. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 27, 449–455.
- Teich, A.F., Arancio, O., 2012. Is the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease therapeutically relevant? *Biochem. J.* 446, 165–177. doi:10.1042/BJ20120653
- Tekkök, S.B., Brown, A.M., Westenbroek, R., Pellerin, L., Ransom, B.R., 2005. Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity. *J. Neurosci. Res.* 81, 644–652. doi : 10.1002/jnr.20573
- Thal, D.R., Braak, H., 2005. [Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease]. *Pathol.* 26, 201–213. doi:10.1007/s00292-004-0695-4
- Thévenaz, P., Ruttimann, U.E., Unser, M., 1998. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process. Publ. IEEE Signal Process. Soc.* 7, 27–41. doi:10.1109/83.650848
- Thorens, B., Mueckler, M., 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E141–145. doi:10.1152/ajpendo.00712.2009
- Thornalley, P.J., 2005. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 111–117. doi:10.1196/annals.1333.014
- Thornalley, P.J., 1996. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* 27, 565–573.
- Timmons, S.D., Geisert, E., Stewart, A.E., Lorenzon, N.M., Foehring, R.C., 2004. alpha2-Adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidal neurons. *Brain Res.* 1014, 184–196. doi : 10.1016/j.brainres.2004.04.025
- Tokarz, P., Kaarniranta, K., Blasiak, J., 2016. Role of the Cell Cycle Re-Initiation in DNA Damage Response of Post-Mitotic Cells and Its Implication in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Rejuvenation Res.* 19, 131–139. doi:10.1089/rej.2015.1717
- Tominaga-Yoshino, K., Uetsuki, T., Yoshikawa, K., Ogura, A., 2001. Neurotoxic and neuroprotective effects of glutamate are enhanced by introduction of amyloid precursor protein cDNA. *Brain Res.* 918, 121–130.
- Tomioka, R., Okamoto, K., Furuta, T., Fujiyama, F., Iwasato, T., Yanagawa, Y., Obata, K., Kaneko, T., Tamamaki, N., 2005. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1587–1600. doi : 10.1111/j.1460-9568.2005.03989.x
- Tomioka, R., Rockland, K.S., 2007. Long-distance corticocortical GABAergic neurons in the adult monkey white and gray matter. *J. Comp. Neurol.* 505, 526–538. doi:10.1002/cne.21504
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 13–25. doi:10.1038/nrn1008
- Treviño, M., Frey, S., Köhr, G., 2012. Alpha-1 adrenergic receptors gate rapid orientation-specific reduction in visual discrimination. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 22, 2529–2541. doi:10.1093/cercor/bhr333
- Tronel, S., Feenstra, M.G.P., Sara, S.J., 2004. Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 11, 453–458. doi:10.1101/lm.74504
- Tzingounis, A.V., Kobayashi, M., Takamatsu, K., Nicoll, R.A., 2007. Hippocalcin gates the calcium activation of the slow afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 53, 487–493. doi : 10.1016/j.neuron.2007.01.011
- Uldry, M., Thorens, B., 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* 447, 480–489. doi:10.1007/s00424-003-1085-0
- Urenjak, J., Williams, S.R., Gadian, D.G., Noble, M., 1993. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 981–989.
- Uzakov, S., Frey, J.U., Korz, V., 2005. Reinforcement of rat hippocampal LTP by holeboard training. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 12, 165–171. doi:10.1101/lm.89305

- Vaishnavi, S.N., Vlassenko, A.G., Rundle, M.M., Snyder, A.Z., Mintun, M.A., Raichle, M.E., 2010. Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17757–17762. doi:10.1073/pnas.1010459107
- Vannucci, S.J., Clark, R.R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C.B., Davies, P., Maher, F., Simpson, I.A., 1998a. Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev. Neurosci.* 20, 369–379.
- Vannucci, S.J., Koehler-Stec, E.M., Li, K., Reynolds, T.H., Clark, R., Simpson, I.A., 1998b. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res.* 797, 1–11.
- Vannucci, S.J., Maher, F., Simpson, I.A., 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2–21.
- Vannucci, S.J., Reinhart, R., Maher, F., Bondy, C.A., Lee, W.H., Vannucci, R.C., Simpson, I.A., 1998c. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res.* 107, 255–264.
- Vaucher, E., Linville, D., Hamel, E., 1997. Cholinergic basal forebrain projections to nitric oxide synthase-containing neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 79, 827–836.
- Vaughn, A.E., Deshmukh, M., 2008. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* 10, 1477–1483. doi:10.1038/ncb1807
- Venkatesan, C., Song, X.Z., Go, C.G., Kurose, H., Aoki, C., 1996. Cellular and subcellular distribution of alpha 2A-adrenergic receptors in the visual cortex of neonatal and adult rats. *J. Comp. Neurol.* 365, 79–95. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960129)365:1<79 : AID-CNE7>3.0.CO;2-G
- Vialou, V., Balasse, L., Callebert, J., Launay, J.-M., Giros, B., Gautron, S., 2008. Altered aminergic neurotransmission in the brain of organic cation transporter 3-deficient mice. *J. Neurochem.* 106, 1471–1482. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05506.x
- Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medraño-Fernández, I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., Rodríguez de Córdoba, S., Guinovart, J.J., 2007. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10, 1407–1413. doi : 10.1038/nn1998
- Villalobos, C., Foehring, R.C., Lee, J.C., Andrade, R., 2011. Essential role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the expression, regulation, and gating of the slow afterhyperpolarization current in the cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 18303–18312. doi:10.1523/JNEUROSCI.3203-11.2011
- Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoëke, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., Ames, D., Rowe, C.C., Masters, C.L., Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group, 2013. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 12, 357–367. doi:10.1016/S1474-4422(13)70044-9
- Villemagne, V.L., Mulligan, R.S., Pejoska, S., Ong, K., Jones, G., O'Keefe, G., Chan, J.G., Young, K., Tochon-Danguy, H., Masters, C.L., Rowe, C.C., 2012. Comparison of 11C-PiB and 18F-florbetaben for A β imaging in ageing and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39, 983–989. doi:10.1007/s00259-012-2088-x
- Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chételat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szoëke, C., Salvado, O., Martins, R., O'Keefe, G., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Ames, D., Masters, C.L., Rowe, C.C., 2011. Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 69, 181–192. doi:10.1002/ana.22248
- Vitek, M.P., Bhattacharya, K., Glendening, J.M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., Manogue, K., Cerami, A., 1994. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4766–4770.
- Vlassenko, A.G., Vaishnavi, S.N., Couture, L., Sacco, D., Shannon, B.J., Mach, R.H., Morris, J.C., Raichle, M.E., Mintun, M.A., 2010. Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17763–17767. doi:10.1073/pnas.1010461107
- Vogalis, F., Storm, J.F., Lancaster, B., 2003. SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3155–3166.
- Voutsinos-Porche, B., Bonvento, G., Tanaka, K., Steiner, P., Welker, E., Chatton, J.-Y., Magistretti, P.J., Pellerin, L., 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37, 275–286.
- Walhovd, K.B., Fjell, A.M., Brewer, J., McEvoy, L.K., Fennema-Notestine, C., Hagler, D.J., Jennings, R.G., Karow, D., Dale, A.M., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Combining MR imaging, positron-emission tomography, and CSF biomarkers in the diagnosis and prognosis of Alzheimer disease. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 31, 347–354. doi:10.3174/ajnr. A1809

- Walmsley, A.R., Barrett, M.P., Bringaud, F., Gould, G.W., 1998. Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* 23, 476–481.
- Walz, W., 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36, 291–300.
- Walz, W., Mukerji, S., 1988. Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia* 1, 366–370. doi:10.1002/glia.440010603
- Wamelink, M.M.C., Struys, E.A., Jakobs, C., 2008. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J. Inher. Metab. Dis.* 31, 703–717. doi:10.1007/s10545-008-1015-6
- Wang, A.C., Jensen, E.H., Rexach, J.E., Vinters, H.V., Hsieh-Wilson, L.C., 2016. Loss of O-GlcNAc glycosylation in forebrain excitatory neurons induces neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 15120–15125. doi:10.1073/pnas.1606899113
- Wang, F., Smith, N.A., Xu, Q., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., Takano, T., Bekar, L., Nedergaard, M., 2012. Astrocytes modulate neural network activity by Ca²⁺-dependent uptake of extracellular K⁺. *Sci. Signal.* 5, ra26. doi : 10.1126/scisignal.2002334
- Wang, G.-S., Chang, N.-C., Wu, S.-C., Chang, A.C., 2002. Regulated expression of alpha2B adrenoceptor during development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 225, 142–152. doi:10.1002/dvdy.10141
- Wang, H., Tan, L., Wang, H.-F., Liu, Y., Yin, R.-H., Wang, W.-Y., Chang, X.-L., Jiang, T., Yu, J.-T., 2015. Magnetic Resonance Spectroscopy in Alzheimer's Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Alzheimers Dis. JAD* 46, 1049–1070. doi:10.3233/JAD-143225
- Wang, M., Gamo, N.J., Yang, Y., Jin, L.E., Wang, X.-J., Laubach, M., Mazer, J.A., Lee, D., Arnsten, A.F.T., 2011. Neuronal basis of age-related working memory decline. *Nature* 476, 210–213. doi:10.1038/nature10243
- Wang, M., Ramos, B.P., Paspalas, C.D., Shu, Y., Simen, A., Duque, A., Vijayraghavan, S., Brennan, A., Dudley, A., Nou, E., Mazer, J.A., McCormick, D.A., Arnsten, A.F.T., 2007. Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129, 397–410. doi : 10.1016/j.cell.2007.03.015
- Wang, P., Hanover, J.A., 2013. Nutrient-driven O-GlcNAc cycling influences autophagic flux and neurodegenerative proteotoxicity. *Autophagy* 9, 604–606. doi:10.4161/auto.23459
- Wang, T., Lao, U., Edgar, B.A., 2009. TOR-mediated autophagy regulates cell death in *Drosophila* neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* 186, 703–711. doi:10.1083/jcb.200904090
- Wang, Y., Zhang, Q.J., Liu, J., Ali, U., Gui, Z.H., Hui, Y.P., Wang, T., Chen, L., Li, Q., 2010. Noradrenergic lesion of the locus coeruleus increases the firing activity of the medial prefrontal cortex pyramidal neurons and the role of alpha2-adrenoceptors in normal and medial forebrain bundle lesioned rats. *Brain Res.* 1324, 64–74. doi : 10.1016/j.brainres.2010.02.009
- Waterhouse, B.D., Azizi, S.A., Burne, R.A., Woodward, D.J., 1990. Modulation of rat cortical area 17 neuronal responses to moving visual stimuli during norepinephrine and serotonin microiontophoresis. *Brain Res.* 514, 276–292.
- Waterhouse, B.D., Moises, H.C., Woodward, D.J., 1998. Phasic activation of the locus coeruleus enhances responses of primary sensory cortical neurons to peripheral receptive field stimulation. *Brain Res.* 790, 33–44.
- Waterhouse, B.D., Mouradian, R., Sessler, F.M., Lin, R.C., 2000. Differential modulatory effects of norepinephrine on synaptically driven responses of layer V-barrel field cortical neurons. *Brain Res.* 868, 39–47.
- Waterhouse, B.D., Woodward, D.J., 1980. Interaction of norepinephrine with cerebrocortical activity evoked by stimulation of somatosensory afferent pathways in the rat. *Exp. Neurol.* 67, 11–34.
- Wautier, J.L., Guillausseau, P.J., 2001. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab.* 27, 535–542.
- Weiner, M.W., Aisen, P.S., Jack, C.R., Jagust, W.J., Trojanowski, J.Q., Shaw, L., Saykin, A.J., Morris, J.C., Cairns, N., Beckett, L.A., Toga, A., Green, R., Walter, S., Soares, H., Snyder, P., Siemers, E., Potter, W., Cole, P.E., Schmidt, M., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. The Alzheimer's disease neuroimaging initiative: progress report and future plans. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 6, 202–211.e7. doi : 10.1016/j.jalz.2010.03.007
- Wender, R., Brown, A.M., Fern, R., Swanson, R.A., Farrell, K., Ransom, B.R., 2000. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 6804–6810.
- Werner, H., Raizada, M.K., Mudd, L.M., Foyt, H.L., Simpson, I.A., Roberts, C.T., LeRoith, D., 1989. Regulation of rat brain/HepG2 glucose transporter gene expression by insulin and insulin-like growth

- factor-I in primary cultures of neuronal and glial cells. *Endocrinology* 125, 314–320. doi:10.1210/endo-125-1-314
- Whittam, R., 1962. The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem. J.* 82, 205–212.
- Williamson, D.H., Lund, P., Krebs, H.A., 1967. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem. J.* 103, 514–527.
- Wilson, J.E., 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206, 2049–2057.
- Wimalasena, K., 2011. Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Med. Res. Rev.* 31, 483–519. doi:10.1002/med.20187
- Winkler, E.A., Nishida, Y., Sagare, A.P., Rege, S.V., Bell, R.D., Perlmutter, D., Sengillo, J.D., Hillman, S., Kong, P., Nelson, A.R., Sullivan, J.S., Zhao, Z., Meiselman, H.J., Wenby, R.B., Soto, J., Abel, E.D., Makshanoff, J., Zuniga, E., De Vivo, D.C., Zlokovic, B.V., 2015. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat. Neurosci.* 18, 521–530. doi:10.1038/nn.3966
- Winklewski, P.J., Radkowski, M., Wszedybyl-Winkiewska, M., Demkow, U., 2017. Stress Response, Brain Noradrenergic System and Cognition. *Adv. Exp. Med. Biol.* doi:10.1007/5584_2016_204
- Winzer-Serhan, U.H., Raymon, H.K., Broide, R.S., Chen, Y., Leslie, F.M., 1997. Expression of alpha 2 adrenoceptors during rat brain development--I. Alpha 2A messenger RNA expression. *Neuroscience* 76, 241–260.
- Wolk, D.A., Price, J.C., Saxton, J.A., Snitz, B.E., James, J.A., Lopez, O.L., Aizenstein, H.J., Cohen, A.D., Weissfeld, L.A., Mathis, C.A., Klunk, W.E., De-Kosky, S.T., DeKoskym, S.T., 2009. Amyloid imaging in mild cognitive impairment subtypes. *Ann. Neurol.* 65, 557–568. doi:10.1002/ana.21598
- Wree, A., 1990. Principles of the 2-deoxyglucose method for the determination of the local cerebral glucose utilization. *Eur. J. Morphol.* 28, 132–138.
- Xiao, Z., Deng, P.-Y., Rojanathammanee, L., Yang, C., Grisanti, L., Permpoonputtana, K., Weinschenker, D., Doze, V.A., Porter, J.E., Lei, S., 2009. Noradrenergic depression of neuronal excitability in the entorhinal cortex via activation of TREK-2 K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 284, 10980–10991. doi:10.1074/jbc.M806760200
- Xiao-Hua Ji, Xiao-Hua Cao, Chun-Lei Zhang, Ze-Jun Feng, Xue-Han Zhang, Lan Ma, Bao-Ming Li, 2007. Pre- and Postsynaptic β -Adrenergic Activation Enhances Excitatory Synaptic Transmission in Layer V/VI Pyramidal Neurons of the Medial Prefrontal Cortex of Rats. *Cereb. Cortex* 18, 1506–1520.
- Yamada, K., Noguchi, T., 1999. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* 337 (Pt 1), 1–11.
- Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Tanaka, K., Wada, K., Inoue, Y., 1996. EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport* 7, 2013–2017.
- Yan, S.D., Stern, D.M., 2005. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid- β peptide alcohol dehydrogenase (ABAD): Mitochondria and Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 161–171. doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00427.x
- Yan, X.X., Garey, L.J., 1997. Morphological diversity of nitric oxide synthesising neurons in mammalian cerebral cortex. *J. Hirnforsch.* 38, 165–172.
- Yao, J., Irwin, R.W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R.T., Brinton, R.D., 2009. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14670–14675. doi:10.1073/pnas.0903563106
- Yin, Z., Raj, D., Saiepour, N., Van Dam, D., Brouwer, N., Holtman, I.R., Eggen, B.J.L., Möller, T., Tamm, J.A., Abdourahman, A., Hol, E.M., Kamphuis, W., Bayer, T.A., De Deyn, P.P., Boddeke, E., 2017. Immune hyperreactivity of A β plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.021
- Yu, W.H., Kumar, A., Peterhoff, C., Shapiro Kulnane, L., Uchiyama, Y., Lamb, B.T., Cuervo, A.M., Nixon, R.A., 2004. Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2531–2540. doi : 10.1016/j.biocel.2004.05.010
- Zeitschel, U., Bigl, M., Eschrich, K., Bigl, V., 1996. Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase isoenzymes in rat brain. *J. Neurochem.* 67, 2573–2580.
- Zhang, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H., 1994. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263, 687–689.
- Zhang, Z., Arseneault, D., 2005. Gain modulation by serotonin in pyramidal neurones of the rat prefrontal cortex. *J. Physiol.* 566, 379–394. doi : 10.1113/jphysiol.2005.086066

- Zhou, H.-C., Sun, Y.-Y., Cai, W., He, X.-T., Yi, F., Li, B.-M., Zhang, X.-H., 2013. Activation of β 2-adrenoceptor enhances synaptic potentiation and behavioral memory via cAMP-PKA signaling in the medial prefrontal cortex of rats. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 20, 274–284. doi:10.1101/lm.030411.113
- Zilka, N., Novak, M., 2006. The tangled story of Alois Alzheimer. *Bratisl. Lek. Listy* 107, 343–345.
- Zlokovic, B.V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201. doi : 10.1016/j.neuron.2008.01.003
- Zu, Z., Spear, J., Li, H., Xu, J., Gore, J.C., 2014. Measurement of regional cerebral glucose uptake by magnetic resonance spin-lock imaging. *Magn. Reson. Imaging* 32, 1078–1084. doi : 10.1016/j.mri.2014.06.002